

Heidi Vesterinen

Kontaminaatiot kliinisen bakteriologian PCR-laboratoriossa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko ylempi AMK

Kliininen asiantuntija

Opinnäytetyö

23.11.2014

| | |
|--|--|
| Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika | Heidi Vesterinen Kontaminaatiot kliinisen bakteriologian PCR-laboratoriossa 77 sivua 23.11.2014 |
| Tutkinto | Bioanalyttikko YAMK |
| Koulutusohjelma | Kliininen asiantuntija |
| Ohjaaja(t) | yliopettaja, Riitta Lumme kliininen asiantuntija, Risto Hilla |
| <p>Polymeraasiketjureaktio eli PCR on yksi geenitekniikan sovelluksista, jonka avulla voidaan tunnistaa esimerkiksi taudinaiheuttajabakteereita potilasnäytteistä. PCR-menetelmä on herkkä kontaminaatiolle, mikä voi aiheuttaa lisätöitä henkilökunnalle ja lisäkustannuksia organisaatiolle. Yleisbakteeri (YB)-PCR-menetelmä on erityisen herkkä kontaminaatioille, sillä se tunnistaa lähes kaikki bakteerilajit.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, mitä bakteerikontaminaatiolajeja HUSLAB:n kliinisen mikrobiologian PCR-laboratoriossa on havaittu ja miten niiden määrä on muuttunut vuosien 2010-2013 aikana sekä minkälaisia toiminnan muutoksia samassa PCR-laboratoriossa on tehty tuona aikana. Näiden tietojen avulla selvitettiin sitä, onko jollakin toiminnan muutoksilla yhteyttä bakteerikontaminaatiolöydösmääriin. Opinnäytetyön tavoitteena oli vähentää kontaminaatioista johtuvia lisäkustannuksia sekä henkilökunnan että organisaation tasolla ja lisätä ymmärrystä kontaminaatioiden ehkäisemiseen sekä antaa lisätukea tulevaisuudessa siihen, miten kontaminaatiotilanteissa tulisi toimia.</p> <p>Aineistoksi kerättiin potilastietojärjestelmästä vuosien 2010-2013 välisenä aikana kontaminaatioiksi luokitellut YB-PCR tulokset. Samalta ajalta kerättiin erilaisista dokumenteista toiminnan muutoksia, joita PCR-laboratoriossa oli tehty. Näiden välisiä yhteyksiä analysoitiin korrelaatiokertoimen ja khii toiseen-riippumattomuustestin avulla. Opinnäytetyön tulosten pohjalta löytyi neljä toiminnan muutosta, jolla on ollut yhteyttä jonkin bakteerikontaminaatiolajin määrän lisääntymiseen. Millään toiminnan muutoksella ei ollut yhteyttä bakteerikontaminaatiolajien määrän vähentymiseen.</p> <p>Tämän opinnäytetyön pohjalta voidaan todeta, että kontaminaatiolähdettä ei useinkaan saada selville. Oleellisinta kontaminaatiotilanteissa ei välttämättä olekaan se, mistä kontaminaatio on lähtöisin, vaan se, miten kontaminaatiosta päästään eroon ja miten niitä voidaan ennaltaehkäistä. PCR-laboratorion henkilökunnalle tulisi tehdä ohjeistukset siitä, miten kontaminaatiotilanteissa tulee ensisijaisesti toimia. Näin kontaminaatiosta voitaisiin mahdollisesti päästä nopeammin eroon ja säästettäisiin niin henkilökunnan kuin organisaation resursseja.</p> | |
| Avainsanat | YB-PCR, kontaminaatio, bakteeri, toiminnan muutos |

| | |
|--|---|
| Author(s) Title Number of Pages Date | Heidi Vesterinen Contaminations in PCR laboratory of clinical bacteriology 77 pages 23 November 2014 |
| Degree | Master of Health Care |
| Degree Programme | Master's Degree Programme in Clinical Expertise |
| Instructor(s) | Riitta Lumme, Principal Lecturer Risto Hilla, Clinical Expertise |
| <p>Polymerase chain reaction or PCR, is one of the applications of gene technology, which allows the diagnosis can be identified by, for example, the disease caused by the bacteria in patient samples. The PCR method is sensitive to contamination, which may cause extra work for the personal and extra costs for the organization. YB-PCR method is more sensitive to contamination, because it detects almost all bacterial species.</p> <p>Purpose of this thesis was to find out what bacteria contamination species in clinical microbiology laboratory of HUSLAB has been found, how bacteria contaminations amount has changed during period 2010-2013, and what kind of changes in working in the PCR laboratory have been made during that time. This information was used to determine whether any of these changes in the working had a contact the changes of amount of bacteria contamination species. The aim of this thesis was to reduce the extra costs because of the contamination for both personal and the organization. The aim was also to increase the understanding the prevention of contamination, as well as to provide additional support in the future as how to personal should work when contamination has been noticed.</p> <p>The data of contaminations of the YB-PCR-results was collected from patient information system during the years 2010-2013. For the same period were collected from various documents of changes in working which was done in the PCR-laboratory. The connections between the collected data were analysed with correlation coefficient and Chi Square-independence test. Based on this thesis, the results found four changes in the working, which had a connection of increase in some bacteria contamination species. No changes in working had connection of decrease in some bacteria contamination species.</p> <p>Based on this thesis it can be concluded that the source of contamination is often not identified. When contamination has been noticed the most essential thing is not necessarily the fact where the contamination is coming from, but how to get rid of contamination and how contaminations can be prevented. First of all to the PCR laboratory personal should be done instructions on how to operate when contamination has been noticed. With the instructions the contamination could possibly get rid of more quickly, and would save both for personal and the organization's resources.</p> | |
| Keywords | YB-PCR, contamination, bacteria, change of working |

Sisällys

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | PCR-menetelmä diagnostiikassa | 2 |
| 2.1 | PCR bakteriologisessa diagnostiikassa | 3 |
| 2.2 | Työvaiheet bakteriologian PCR-laboratoriossa | 3 |
| 2.3 | Pukeutuminen ja siivoaminen bakteriologian PCR-laboratoriossa | 4 |
| 2.4 | YB-PCR:n erityispiirteet | 5 |
| 3 | Kontaminaatiolähteet PCR:ssä diagnostiikassa | 5 |
| 3.1 | Ympäristö ja henkilökunta | 7 |
| 3.2 | Käyttötavarat | 7 |
| 3.3 | Reagenssit ja laitteet | 8 |
| 4 | Kontaminaatioiden ehkäiseminen ja dekontaminointi | 9 |
| 4.1 | Ympäristö | 10 |
| 4.2 | Henkilökunta | 11 |
| 4.3 | Käyttötavarat | 11 |
| 4.4 | Reagenssit ja laitteet | 13 |
| 5 | Tutkimuksen tarkoitus, tutkimuskysymykset ja tavoite | 14 |
| 6 | Aineiston kerääminen ja analysointimenetelmät | 15 |
| 7 | Tulokset | 20 |
| 7.1 | Kontaminaatiolöydöslajien ja YB-PCR:n näytteiden määrät | 20 |
| 7.2 | Kontaminaatiolöydösmäärien muutokset YB-PCR:ssä kuukausittain | 22 |
| 7.3 | Toiminnan muutokset PCR-laboratoriossa vuosina 2010-2013 | 41 |
| 7.3.1 | Ympäristö | 41 |
| 7.3.2 | Henkilökunta | 44 |
| 7.3.3 | Käyttötavarat | 45 |
| 7.3.4 | Reagenssit ja laitteet | 46 |
| 7.4 | Toiminnan muutosten ja kontaminaatiolajien määrien muutoksien välinen yhteys | 49 |
| 8 | Tulosten tarkastelu | 66 |
| 9 | Pohdinta | 68 |

| | | |
|-----|--|----|
| 9.1 | Luotettavuus | 68 |
| 9.2 | Eettisyys | 70 |
| 9.3 | Tulosten johtopäätökset ja kehittämis ehdotukset | 71 |
| | Lähteet | 74 |

1 Johdanto

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on yksi geenitekniikan sovelluksista ja menetelmää voidaan hyödyntää myös diagnostiikassa. Geenitekniikanmenetelmät ovat yleistyneet mikrobiologisessa diagnostiikassa ja bakteriologinen diagnostiikka perustuu yhä enenevässä määrin geenitekniikkaan. PCR:n avulla voidaan osoittaa mikrobille spesifistä nukleiinihappoa joko suoraan tai monistamalla mikrobin DNA:ta (Hellstén 2005: 96). Mikrobit voidaan joko identifoida tai etsiä erilaisista potilasnäytteistä muun muassa taudinaiheuttajabakteerien laji- tai toksiinigeenejä.

Riippuen PCR-menetelmästä, se voi tunnistaa ihmisille tautia aiheuttavien bakteerien lisäksi myös ne, jotka eivät tule itse näytteestä vaan ympäristöstä tai henkilökunnasta. PCR:n etuna oleva herkkyys tunnistaa mikrobeja onkin samalla menetelmän ongelmakohta. PCR on herkkä kontaminaatiolle ja voi tämän vuoksi aiheuttaa vääriä positiivisia potilastuloksia. (Hellstén 2005: 97.) Menetelmän herkkyytensä vuoksi PCR-työskentely vaatiikin ehdottoman tarkkaa työskentelyä. Eri lähteiden mukaan diagnostiikkaan liittyvässä PCR-työskentelyssä on monia työvaiheita, jolloin kontaminaatioita voi syntyä. Jos jokin työvaihe, työssä käytettävät välineet tai reagenssit ovat kontaminoituneet PCR:ä tehtäessä, aiheuttaa se mahdollisten väärin positiivisten potilasnäytteiden lisäksi lisätöitä henkilökunnalle ja lisäkustannuksia organisaatiolle. (Aslanzadeh 2004; Gefrides – Powell – Donley - Kahn 2010; Corless ym. 2000.)

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriin kuuluvan liikelaitoksen, HUSLAB:n, kliinisen bakteriologian laboratoriossa on käytössä yleisbakteeri-PCR (YB-PCR), joka tunnistaa suurimman osan bakteerilajeista. YB-PCR tunnistaa ihmisen normaaliflooraan kuuluvien sekä ihmiselle patogeenisten bakteerien lisäksi myös ympäristöbakteerit, joka tekee YB-PCR:stä erityisen herkän menetelmän kontaminaatioille. YB-PCR:ä on käytetty HUSLAB:n kliinisen mikrobiologian laboratoriossa menetelmänä jo lähemmäs kymmenen vuoden ajan. Menetelmää on parannettu viimeisen neljän vuoden aikana tunnistamaan entistä herkemmin eri bakteerilajeja, mikä on tehnyt menetelmästä aiempaa herkemmän kontaminaatioille. Laboratoriossa on tehty muutoksia PCR-toimintatapoihin, joilla on pyritty poistamaan kontaminaatioita aiheuttavia tekijöitä sekä vähentämään kontaminaatioita mahdollisesti aiheuttavia tekijöitä. Tähän mennessä laboratoriossa on yksi varmistettu kontaminaatio-ongelma, mikä on pystytty yhdistämään käytössä oleviin reagensseihin.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, mitä kontaminaatiolöydöksiä vuosien 2010-2013 aikana diagnostiikassa on esiintynyt, kuinka kontaminaatiolajien määrä on muuttunut ja minkälaisia erilaisia toiminnan muutoksia PCR-laboratoriossa on tehty tuona aikana? Tarkoituksena on myös selvittää, onko jollakin toiminnan muutoksella yhteyttä jonkin kontaminaatiolajin määrän muuttumiseen? Opinnäytetyön tavoitteena on lisätä ymmärrystä kontaminaatioiden ehkäisemiseen bakteriologian laboratoriossa ja antaa lisätukea tulevaisuudessa päätöksien tekemiseen, kun mietitään toimintatapojen kehittämistä PCR-työskentelyssä. Kun tietämys kontaminaatioiden aiheuttajiin ja niiden ehkäisemiseen lisääntyy, voidaan jatkossa mahdollisesti vähentää lisätoista aiheutuvia kustannuksia, joita tulee kun kontaminaation aiheuttajaa pyritään selvittämään. Tämän myötävaikutuksesta henkilökunta voisi käyttää työaikansa tehokkaammin potilastutkimustyöhön, koska työaikaa ei kuluisi tekemällä tarpeettomia jatkotutkimuksia kontaminaatio-ongelmien takia.

2 PCR-menetelmä diagnostiikassa

Polymeraasiketjureaktiolla eli PCR:llä (eng. *polymerase chain reaction*) monistetaan deoksiribonukleinihappo (DNA) -jaksoja kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. PCR-reaktio tapahtuu automatisoidussa lämpöblokkissa, jossa lämpötilaa voidaan nostaa ja laskea sykleissä, jotta DNA saadaan monistumaan. Monistuminen tapahtuu syklisen kolmivaiheisen prosessin aikana. Monistuessaan DNA:n kaksoiskierre aukeaa ja kummankin juosteen rinnalle rakentuu uusi DNA-juoste. Yhdestä DNA-jaksosta syntyy näin kaksi samanlaista DNA-jaksoa. DNA-jakso monistuu PCR:ssä jopa miljoonakertaisesti. PCR:n jälkeen monistuneet PCR-tuotteet analysoidaan esimerkiksi agarosigeeliäällä, jossa monistuneet tuotteet saadaan näkyville etidumbromidiväryksen avulla. (Aalto ym. 2002: 382; Glick – Pasternak – Patten 2010: 108, 110; Brown 2006: 182-183.)

PCR:llä on lukemattomia eri sovelluksia mikrobien diagnostiikassa. Sillä voidaan esimerkiksi osoittaa nopeasti suoraan näytteestä jokin tietty mikrobi sairauden diagnosointia varten tai tekniikkaa voidaan käyttää hyödyksi myös esimerkiksi silloin, kun mikrobi ei kasva viljelymenetelmällä. PCR on herkkä menetelmä, erityisesti silloin, kun lähtömateriaalia eli näytteestä eristettyä DNA:ta on hyvin vähän. Tällöin pienikin määrä kontaminaatiota voi aiheuttaa suuren ongelman. Väärät positiiviset tulokset aiheuttavat

lisätöitä henkilökunnalle sekä tarpeettomia jatkotutkimuksia. Suurin osa diagnostiikan PCR-menetelmistä perustuu kolmeen eri vaiheeseen: näytekäsittelyyn, DNA:n monistamiseen ja monistustuotteiden detektointiin. (Suominen – Ollikka 2003: 107-111; Aslanzadeh 2004; Corless ym. 2000.)

2.1 PCR bakteriologisessa diagnostiikassa

Bakteeri voidaan identifioida PCR-menetelmällä esimerkiksi monistamalla sen 16S rRNA geenin osittain tai lähes kokonaan. Kun DNA on eristetty, monistettu ja detektoitu, monistustuote sekvensoidaan, jonka avulla määritetään monistetun DNA-jakson nukleotidijärjestys. Saatua sekvenssiä verrataan julkisissa tietokannoissa oleviin sekvensseihin. (Aalto ym. 2002: 382; Suominen – Ollikka 2003: 50.) HUSLAB:ssa käytössä oleva YB-PCR perustuu bakteerin 16S rRNA geenialueen sekvensoimiseen. YB-PCR tunnistaa nimensä mukaisesti lajitasolla suurimman osan kaikista bakteereista, minkä vuoksi YB-PCR on erityisen herkkä kontaminaatioille. 16S rRNA on yleisimmin käytetty PCR-menetelmä tunnistamaan DNA:ta laajasta joukosta eri organismeja (Corless ym. 2000).

2.2 Työvaiheet bakteriologian PCR-laboratoriossa

Kliinisen bakteriologian PCR-laboratoriossa on tarkat toimintatavat, joiden mukaan PCR-tiloissa työskennellään. Muun muassa työskentelyllä eri huoneissa, tarvikkeiden valinnoilla sekä siivoamisella pyritään ehkäisemään kontaminaatioiden syntymistä. Esimerkiksi kaikki PCR-työskentelyssä käytetyt pipetinkärjet ovat suodattimillisia, joilla estetään aerosolien siirtymistä edelliseltä pipetointikerralta seuraavan pipetointiin ja pienet PCR-monistusputket sekä reaktiomixissä käytetyt kaupalliset reagenssit ovat DNA-vapaita. PCR-työskentelyn eri työvaiheet, joita ovat näytekäsittely, PCR-reaktiomixin tekeminen, DNA:n monistaminen ja DNA:n detektoiminen tehdään erillisissä tiloissa.

Nukleiinihappomääritykseen tulevan näytteen saavuttua analysoivaan laboratorioon, näyte käsitellään ensin PCR:ä varten *näytekäsittelyhuoneessa*. Näytekäsittelyhuoneessa DNA eristetään näytteestä kaupallisella menetelmällä. Eristettyä DNA:ta käytetään lähtömateriaalina PCR:ssä ja sitä kutsuaan templaatiksi. Tämän jälkeen valmistetaan reaktiomix erillisessä *puhtaassa huoneessa*. Puhdas huone

on tila- ja puhtausvaatimuksiltaan kaikista kriittisin PCR-tiloista ja puhdas huoneen tulee olla muusta laboratoriosta mahdollisimman hyvin eristetty. Reaktiomixiin tarvittavat reagenssit ovat kaupallisia, ja reagenssit pipetoidaan puhtaassa huoneessa menetelmäohjeen mukaisesti. Valmis reaktiomix sisältää kaikki PCR:ssä tarvittavat komponentit, jotta näytteestä eristettyä DNA:ta voidaan monistaa PCR:ssä. Valmis reaktiomix jaetaan pieniin PCR-monistusputkiin, joihin jokaiseen lisätään yhden näytteen eristetty DNA erillisessä *templaattihuoneessa*. DNA:n lisäyksen jälkeen reaktioputket viedään monistumaan PCR-monistulaitteeseen, joka sijaitsee *laitehuoneessa*. Monistumisen jälkeen monistetut DNA:t ajetaan *detektiohuoneessa* agarosigeelille, jonka jälkeen ne detektoidaan UV-valolla. Detektiohuoneessa käytyään, henkilökunta ei voi enää palata huoneissa taaksepäin saman päivän aikana kontaminaatoriskin takia.

2.3 Pukeutuminen ja siivoaminen bakteriologian PCR-laboratoriossa

Kaikissa tiloissa, joissa PCR:ä tehdään, on ohjeistus, kuinka huoneessa tulee toimia. Ohjeissa on kerrottu, kuinka henkilökunnan tulee pukeutua ja miten huone siivotaan sieltä poistuttaessa. Jokaisessa huoneessa käytetään kertakäyttökäsineitä, joita on kahdet päällekkäin. Päällimmäiset käsineet vaihdetaan aina, jos niille tulee esimerkiksi reagenssi- tai näyteroiskeita. Näytekäsittely- ja detektiohuoneessa, sekä puhtaassa huoneessa käytetään mikrokuituista suojatakkia, joka vaihdetaan kerran viikossa. Puhtaassa huoneessa omat työkengät vaihdetaan ns. puhdas huone -kenkiin ja päähän laitetaan suojalakki, jolla peitetään kaikki hiukset.

PCR-tilat siivoaa PCR diagnostiikkaa tekevä henkilökunta. Kaikki huoneet siivotaan kerran kuukaudessa kunnolla, joka tarkoittaa kaikkien pesua kestävien pintojen pyyhkimistä klooripohjaisella pesuaineella ja mahdollisimman DNA-vapaaksi todetulla vedellä. Kerran viikossa kaikki käytössä olleet telineet puhdistetaan saippuapohjaisella pesuaineella, jonka jälkeen ne viedään autoklavoitavaksi. Kerran viikossa puhtaassa huoneessa lattia pyyhitään kuivalla mopilla, kerran kuukaudessa käytetään klooripohjaista pesuainetta. Päivittäin käytössä olleet työpöydät ja laminaarin pöytätaaso puhdistetaan klooripohjaisella pesuaineella, jonka jälkeen pinnat pyyhitään mahdollisimman DNA-vapaaksi todetulla vedellä. Käytössä olleiden laminaarikaappien ja puhtaan huoneen UV-valot ajastetaan päälle työskentelyn päätyttyä 1 tunniksi joka päivä. Puhtaasta huoneesta tuodaan kaikki roskat pois ja roskapussit tyhjennetään kaikissa huoneissa päivittäin. Puhtaan huoneen eteisessä on myös tarramatto, joka on kertakäyttöinen antimikrobista ainetta sisältävä matto. Maton tarkoituksena on estää

bakteerien kasvu ja estää kengänpohjissa mahdollisesti olevia DNA-jäämiä kulkeutumasta puhtaaseen huoneeseen. Kaikki siivoukset tehdään vasta sitten, kun työskentely ko. huoneessa on päättynyt.

2.4 YB-PCR:n erityispiirteet

Tehtäessä erityisen kontaminaatioherkkää YB-PCR:ä, on toimintatapoja hiottu perustoimintoja tarkemmaksi, jotta mahdollisilta kontaminaatioilta välttyttäisiin. Näytekäsittelyhuoneessa ja puhtaassa huoneessa käytetään tavallisten kertakäyttökäsineiden sijaan steriilejä kertakäyttökäsineitä. Käsineitä vaihdetaan myös useammin, esimerkiksi silloin, kun pakastimen ovi avataan otettaessa reagenssia lisää.

YB-PCR:n tulevat näytteet eristetään DNA-eristysautomaatilla, jossa on yksittäiset eristysreagenssikasetit. Reagenssikasettien päällä on foliosuojat, jotka pyyhitään 70% etanolilla ja mahdollisimman DNA-vapaaksi todistetulla vedellä. Tämän jälkeen kasetteja UV-valotetaan 15 minuuttia. Foliot rei'itetään ennen DNA:n eristystämistä ja folioiden puhdistamisella on pyritty poistamaan mahdollisesti folioiden päällä olevat ympäristöstä tulleet DNA-jäämät.

YB-PCR:ssä käytössä olevaan reaktiomixiin lisättävä polymeraasi tarvitsee kylmäsäilytyksen koko pipetoinnin ajan, ennen kuin reaktioputket saadaan monistumaan monistuslaitteeseen. Tämän takia kaikki putket tulee säilyttää pipetoinnin ajan kylmäblokkissa, joka autoklavoidaan jokaisen käyttökerran jälkeen. Kylmäblokki säilytetään pakastimessa, josta se otetaan huoneenlämpöön juuri ennen pipetoimisen aloittamista.

3 Kontaminaatiolähteet PCR:ssä diagnostiikassa

Biokemiassa kontaminaatiolla tarkoitetaan mikrobin pääsyä paikkaan, johon sitä ei haluta. Tämän tutkimuksen yhteydessä kontaminaatioilla tarkoitetaan nimenomaan pieniä määriä bakteerin DNA:ta, joka ei ole tullut itse näytteestä vaan ympäristöstä.

Bakteerit tarvitsevat ravintoaineita lisääntyäkseen ja elääkseen. Toiset bakteerit ovat tarvitsemiensa ravinteiden suhteen vaatimattomampia, kuin toiset bakteerit.

Päästessään lisääntymään kontrolloimattomasti, varsinkin vaatimattomille bakteereille voi riittää kasvupaikaksi esimerkiksi vesihaude tai kosteana pysyvä pinta tai astia. Kukin bakteeri toimii kuten mikä tahansa elävä solu eli reagoi ympäristössä tapahtuviin muutoksiin. Ihminen voi yrittää rajoittaa bakteerin lisääntymistä muuttamalla bakteerin elinympäristöä epäedulliseksi. Mahdollisia muutoksia, joita ihminen voi tehdä bakteerin kasvuympäristöön ovat esimerkiksi ympäristön pH:n ja lämpötilan muutokset sekä saatavan veden ja ravinteiden määrän vähentäminen. (Sojakka – Välimäki 2011: 81-85,106, 223.)

Eri lähteiden mukaan PCR:ssä on monia erilaisia kontaminaatiolähteitä, jotka voivat aiheuttaa ristikontaminaatioita eli vääriä positiivisia tuloksia potilasnäytteissä. Aslanzadehin (2004) artikkelissa mainitaan kolme potentiaalisinta lähdettä: 1) mikrobien suuri määrä potilasnäytteissä 2) plasmidikloonit laboratorioympäristössä, jotka ovat peräisin edellisistä analyyseistä ja 3) saman kohdesekvenssin jatkuva monistaminen, mikä voi johtaa monistetun tuotteen kertymiseen laboratoriossa. Gefrides ym. (2010) kirjoittavat artikkelissaan, että potentiaalisia kontaminaatiolähteitä PCR-työskentelyssä ovat käsiteltävät näytteet, henkilökunta, kontaminoituneet reagenssit tai kontaminoituneet käyttötavarat. Corless ym. (2000) toteavat artikkelissaan, että on hyvin vaikeaa päätellä, mistä kontaminaatiot johtuvat. Mahdollisia lähteitä voivat olla muun muassa laboratoriossa käytetty vesi, muovitavarat ja reagenssit.

Tässä opinnäytetyössä erilaiset kontaminaatiolähteet on jaoteltu ympäristöön, henkilökuntaan, käyttötavaroihin sekä reagensseihin ja laitteisiin. Ympäristöön liittyviä kontaminaatiolähteitä ovat tilojen rakenteelliset, kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet sekä tiloissa tapahtuvat muutokset. Henkilökuntaan liittyvät kontaminaatiolähteet ovat henkilökunnan varomaton työskentely ja pukeutuminen, sekä henkilökuntavaihdokset. Käyttötavaroihin liittyvä kontaminaatiolähde on lähinnä käyttötavaroiden riittämätön desinfiointi. Reagensseihin ja laitteisiin liittyvät kontaminaatiolähteet ovat esimerkiksi kontaminaatiot reagensseissa sekä laitteisiin muodostuneet biofilmit. Samaa jaottelua käytetään läpi koko opinnäytetyön, niin kontaminaatiolähteiden, kontaminaatioiden ehkäisemisen kuin opinnäytetyön aineiston keruun ja analysoinnin yhteydessä. Erilaisia kontaminaatiolähteitä esiteltäessä ei löytynyt erikseen vain henkilökuntaan liittyviä tutkimuksia tai artikkeleita, joten tämä on yhdistetty ympäristökategorian kanssa (ks. kohta 3.1). Kontaminaatioiden jaottelu perustuu osittain Geftrideksen ym. (2000) julkaisuun, jossa he mainitsevat kontaminaatiolähteiksi henkilökunnan, reagenssit ja käyttötavarat sekä käsiteltävät näytteet, jotka tässä opinnäytetyössä on vaihdettu

ylipäättään ympäristöön liittyviin kontaminaatiolähteisiin. Käsiteltävät näytteet voivat tuottaa ympäristöön DNA-jäämiä, jotka voivat olla kontaminaatiolähteitä. Reagenssit ja laitteet yhdistettiin samaan kategoriaan, sillä laitteet sisältävät myös reagensseja, jotka voivat olla kontaminoituneita.

3.1 Ympäristö ja henkilökunta

Vuonna 2009 tehdyssä tutkimuksessa (Witt ym. 2009) haluttiin selvittää ympäristön ja ihmisen merkitystä kontaminaatioiden esiintymiseen PCR:ssä. Tutkimuksessa mainitaan yleisesti ajateltavan, että reagenssien sisältämien DNA-jäämien lisäksi myös laboratorioympäristöstä ja ihmisistä kulkeutuu kontaminaatioita PCR:än. Tutkimus tehtiin jättämällä kolme DNA/RNA-vapaata vettä sisältävää, avonaista putkea eri huoneisiin 24 tunnin ajaksi. Putkista otettiin tietyin aikaväleihin vettä, ja jokaisesta otetusta vedestä tehtiin 16S rDNA PCR. Vesistä haluttiin mitata mahdollisen kontaminaation lisääntyminen, mitä pidempään putket olivat auki. Tutkijat havaitsivat, ettei ajalla eikä paikalla ollut mitään vaikutusta kontaminaatioiden lisääntymiseen vesiputkissa. Tutkijat olettivat tutkimusta tehdessään, että kontaminaatiomäärän olisi pitänyt olla suurempi niissä vesiputkissa, jotka olivat pidempään alttiina ympäristölle, mikäli ympäristö aiheuttaisi kontaminaatioita. Tutkijat päätyvät tutkimuksessaan loppuratkaisuun, vaikka kokeessa todettiin pieniä määriä kontaminaatioita, niiden todellinen syy oli todennäköisesti reagensseissa (master mix) ei ympäristössä. Tutkijat kehottavatkin muita tutkijoita pitämään PCR-reagensseja yhtenä potentiaalisimpana selittävänä tekijänä, kun etsitään kontaminaatiolähdettä PCR-työskentelyssä.

3.2 Käyttötavarat

Bonne, Clark, Shearer ja Raidal (2008) kirjoittavat tutkimuksessaan, että PCR reaktioita tehtäessä on ristikontaminaatioiden välttäminen yksi olennaisimmista asioista. Negatiivisista näytteistä voidaan saada suhteellisen helposti vääriä positiivisia tuloksia, jos käytettyjen välineiden kunnollisesta desinfioinnista ei huolehdita.

3.3 Reagenssit ja laitteet

Shen, Rogels ja Kieft (2006) kirjoittavat, että käytetyt kontaminoituneet reagenssit PCR:ssä aiheuttavat vääriä positiivisia tuloksia ja haittaavat merkittävästi kliinistä työskentelyä, kun tutkitaan bakteereita.

Vuonna 2009 Canisius Wilhelmina-nimisessä sairaalassa huomattiin kontaminaatio Q-kuumetta tunnistavassa PCR:ssä. Kontaminaatio havaittiin, kun negatiivinen templaattikontrolli antoi positiivisen tuloksen PCR:ssä. Laboratorio varmisti, että heillä on toimivat, vahvat ennaltaehkäisevät toimenpiteet, jotta ristikontaminaatioilta vältyttäisiin diagnostiikassa. Laboratorio epäili aluksi uusien alukkeiden ja koettimien olevan kontaminaation lähde, joka osoittautui selvitysten myötä vääräksi luuloksi. Samaan aikaan toisessa mikrobiologisessa laboratoriossa (Radboud University Nijmegen Medical Center, RUNMC) havaittiin samoja ongelmia Q-kuumetta tunnistavassa PCR:ssä. Myös tässä laboratoriossa testattiin mahdolliset laboratoriosta tulevat kontaminaatiot, mutta mitään kontaminaatiolähdettä ei löydetty. Ainoaksi yhteiseksi tekijäksi näiden kahden menetelmän välillä todettiin olevan kyseissä PCR:ssä käytetty kaupallinen mastermix. Epäily haluttiin vielä varmistaa, joten mastermixiä lähetettiin kolmanteen laboratorioon, jossa kontaminaatio-ongelmaa ei ollut. Kolmas laboratorio testasi mastermixin omalla PCR:ään ja saivat myös vääriä positiivisia tuloksia. Kontaminaatiosta raportoitiin mastermixiä valmistavalle yritykselle, joka myöhemmin myönsi, että mastermixissä tosiaan löytyi Q-kuumetta aiheuttavan *Coxiella burnetii* DNA:ta. Julkaisussa pohditaan, että kontaminaation aiheuttaja voisi tässä tapauksessa olla BSA (naudan seerumin albumiini), jota lisätään yleisesti PCR reagensseihin; monet maatalaeläimet voivat olla *Coxiella burnetii* kantajia. Julkaisussa sanotaankin, että diagnostiikassa on monia kohtia, jotka voivat aiheuttaa väärän positiivisen tuloksen eikä tämä yksittäinen mastermix/valmistaja ole varmastikaan ainoa laatuaan. (Tilburg ym. 2010.)

Corless ym. (2000) tutkimuksessa kerrotaan, että PCR:ssä käytetyn *Taq* polymeraasin on dokumentoitu sisältävän kontaminaatioita sen valmistusprosessin tai puutteellisen puhdistamisen myötä. *Taq* polymeraasista löydetään yleisimmin *Escherichia coli* tai *Thermus aquaticus* DNA:ta. Myös master mixissä oleva UNG, jota käytetään yleisesti poistamaan edellisen PCR-ajon mahdollisia kontaminaatioita, voi olla itsessään kontaminoitunut.

Erään sairaalan mikrobiologisessa laboratoriossa havaittiin (Lai ym. 1998) *Mycobacterium abscessus* -löydösten määrän nopea kasvu potilaslöydöksistä vuosina 1991-1996. Tutkijat uskovat, että kontaminaatio-ongelman aiheutti yksittäinen *M.abscessus*-kanta. *M.abscessuksen* isolaatiot identifioitiin ja tyypitettiin 19 potilasnäytteestä ja laboratoriossa käytetystä steriilistä tislattua vedestä PFGE- tai DNA (RAPD)-PCR-menetelmällä. Tyypitysten jälkeen tutkijat havaitsivat, että kuudellatoista potilasnäytteestä eristetyllä kannalla ja tislattulla vedellä oli identtinen *M.abscessus* -kanta. Kun laboratoriossa lopetettiin steriilin tislattun veden käyttö ja alettiin käyttämään kaupallisesti valmistettuja reagensseja, ei potilasnäytteistä löytynyt enää *M.abscessuksen* aiheuttamia kontaminaatioita.

Tutkijat halusivat tutkia (Shen ym. 2006), voisiko reagenssien sisältämä vesi olla *Legionella pneumophila* DNA:n kontaminaatiolähteenä. *L. pneumophila* tiedetään olevan kunnallisissa vesitarvikkeissa, ja tutkijat olettavatkin, että kaupalliset reagenssit, etenkin reagenssivesi (80% PCR-reaktion voluumista) voisi olla kontaminaatiolähteenä. Tutkimuksessaan tutkijat testasivat tätä hypoteesia. Tutkimuksen tulosten pohjalta tutkijat kirjoittavat, että pieni määrä kontaminaatiota kunnallisessa, kaupallisessa ja reagenssikittien vesissä voi tosiaan olla tavallista. Tutkijat neuvovatkin, että käytettäessä herkkää PCR-menetelmää, tulee tulosten tulkinnassa olla varovainen mahdollisten väärin positiivisten tulosten takia. Tutkijat kirjoittavat myös, että DNA:n eristämisessä ja PCR reaktiossa käytetty vesi voidaan puhdistaa kontaminaatioista.

4 Kontaminaatioiden ehkäiseminen ja dekontaminointi

Jos PCR-työtä tehdessä kontaminaatiolähteitä ei kontrolloida kunnolla, ilmassa olevat edellisten PCR-ajojen monistustuotteet voivat kontaminoida pahimmillaan laboratorion reagenssit, tavarat sekä ilmanvaihtojärjestelmän (Aslanzadeh 2004). PCR-menetelmän herkkyyden takia erilaisilta pinnoilta pyritään poistamaan niin elävät kuin kuolleet mikrobit, niiden itiöt ja entsyymit. PCR ei tarvitse lähtömateriaaliksi elävää materiaalia vaan pelkkä DNA-jäämä voi aiheuttaa kontaminaatioita. Dekontaminaatiolla tarkoitetaan liian tai kontaminaation poistamista.

Brost, Box ja Fluit (2004) kirjoittavat artikkelissaan, että pian PCR-tekniikan keksimisen ja käytön jälkeen huomattiin, että PCR:n herkkyys tunnistaa pieniä määriä DNA:ta oli menetelmän vahvuus, mutta samalla se oli myös sen heikkous. Ensimmäinen raportoitu

kontaminaatio-ongelma PCR-tekniikkaan liittyen julkaistiin vuonna 1988, jolloin kerrottiin, että HB-virusta tunnistavat alukkeet olivat kontaminoituneet pitkän HBV-insertin sisältävällä plasmidi DNA:lla. Tämän jälkeen on julkaistu lukemattomia määriä artikkeleita siitä, kuinka kontaminaatio-ongelmia voidaan havaita ja kuinka niitä voidaan välttää.

On olemassa eriäviä mielipiteitä siitä, kuinka hyvin kontaminaatioiden syntyyn ja ehkäisemiseen voidaan sitten vaikuttaa. Esimerkiksi Aslanzadeh (2004) kirjoittaa, että on olemassa useita erilaisia keinoja kontaminaatioiden ehkäisemiseen. Gefrides ym. (2010) kirjoittavat taas, että laboratoriossa on oikeastaan vain muutama tapa, jolla henkilökunta voi poistaa tai ennaltaehkäistä kontaminaatioita. He mainitsevat tärkeimmiksi kontaminaation ehkäisijöiksi UV-valon ja autoklavoinnin. Pääasiassa kontaminaatioiden ehkäisemistapojen tarkoituksena on estää ristikontaminaatio edellisen PCR-ajon monistusputkista sekä steriloida kaikki tuotetut monistustuotteet välineistä ja ympäristöstä ennen seuraavaa PCR-ajoa (Aslanzadeh 2004).

4.1 Ympäristö

Mekaanisesti kontaminaatioita voidaan estää yksinkertaisesti eriyttämällä eri PCR-työskentelytilat toisistaan. Näytteiden ja reagenssien käsittely tulee erottaa siitä alueesta, jossa DNA:ta monistetaan ja monistettua tuotetta analysoidaan. (Aslanzedah 2004.) Etenkin puhdas huone tulee erottaa muista huoneista.

Puhdistamisen perusmenetelmänä toimii desinfektio, jolla tarkoitetaan mikrobien kemiallista inhibointia ja tuhoamista. PCR-tilojen erilaisia pintoja ja tavaroita, jotka eivät kestä kuumennusta, voidaankin helposti puhdistaa desinfioidalla. Käytettävän desinfiointiaineen valintaan vaikuttaa tuhottavien bakteerien määrä, laatu ja sijainti. Hyvä desinfiointiaine tehoaa monenlaisiin bakteereihin ja on turvallinen työntekijälle sekä desinfioinnin kohteelle. Desinfiointiaineita tulisi vaihtaa välillä, sillä osa mikrobeista voi muodostaa resistenssin käytettävää ainetta kohtaan. Desinfiointiaineet voidaan luokitella fenoleihin tai aineisiin, joiden teho perustuu joko alkoholeihin, aldehydeihin, aktiiviseen happeen tai halogeeneihin. Yleisistä halogeeneista desinfiointikäytössä ovat kloori, bromi ja jodi. Etenkin klooriyhdisteitä käytetään suurien pintojen, kuten esimerkiksi lattioiden desinfiointiin. Kloori aiheuttaa oksidatiivista tuhoa nukleiinihapolle ja estää sen uudelleen monistumista seuraavassa PCR-ajossa. Alkoholeista yleisimmät desinfiointiaineet ovat etanoli ja isopropanoli. 70-prosenttinen etanoli toimii desinfiointiin

tehokkaimmin. (Sojakka – Välimäki 49-55.) Aslanzadeh (2004) kirjoittaa artikkelissaan, että pöytien pesuun tulisi käyttää 10 % natriumhypokloriittia, jonka jälkeen pesuaine tulisi pyyhkiä pois etanolilla.

UV-säteily jaetaan kolmeen eri aallonpituusalueeseen, joita ovat UVA, UVB ja UVC. Näistä UVC-säteilyä käytetään mikrobien steriloinnissa, sillä se vaikuttaa mikrobien DNA- ja RNA- rakenteisiin tuhoavasti. UVC- valo pystyy tuhoamaan mikrobien resistentit itiöt ja sillä pystytään tuhoamaan mikrobit myös sisäilmasta ja materiaaleista. (Mikrobien desinfiointi UV-valolla. 2010.) UV-säteilyä käytetäänkin apuna mikrobiologisessa puhdistamisessa ympäristöstä. UV-valo ei kuitenkaan läpäise esimerkiksi lasia, vettä tai likakerrosta, eikä se yleensä soviakaan liuosten sterilointiin, sillä se tunkeutuu veteen korkeintaan senttimetrin. Ennen UV-säteilytystä esimerkiksi laminaarikaapissa, kaappi on tyhjennettävä tarpeettomista tavaroista, jotta UV-valo pääsee vaikuttamaan koko työskentelypintaan. UV-valoa tulee pitää päällä tarpeeksi kauan ja tarpeeksi lähellä, jotta sillä on vaikutusta. UV-säteilyn avulla bakteerin normaali toiminta estetään, jolloin sen kasvu pysähtyy ja bakteeri kuolee. (Sojakka – Välimäki 2011: 45.)

4.2 Henkilökunta

Työntekijöiden tulee huomioida, missä kaikkialla heissä voi olla monistustuotteita. Näitä voivat olla esimerkiksi silmälasit, hiukset, kellot, korut ja vaatteet. Henkilökunnan liikkuminen huoneesta toiseen tulee tapahtua oikeassa järjestyksessä, jotta esimerkiksi monistettua DNA:ta ei siirtyisi näyttekäsittelytiloihin, jossa ne voisivat aiheuttaa kontaminaatio-ongelman. (Aslanzedah 2004.)

4.3 Käyttötavarat

Käyttötavaroista voidaan puhdistaa mikrobien jäämistä muun muassa steriloinnin avulla. Steriloinnilla on tarkoitus tuhota kokonaan kaikki bakteerit ja niiden aineenvaihduntatuotteet. Siihen, kuinka hyvin bakteerit tuhoutuvat steriloinnissa, vaikuttaa muun muassa bakteerilaji ja bakteerin kasvukäyrävaihe. Esimerkiksi bakteerien itiömuodot kestävät kuumennusta paremmin kuin kasvuvaiheessa olevat bakteerit. Tärkein ja yleisin sterilointimenetelmä on autoklavointi eli höyrysterilointi. Autoklavointi perustuu kosteaan kuumuuteen, jonka avulla denaturoidaan bakteerien proteiineja. Ennen autoklavointia välineet tulee pestä hyvin. Eri bakteerilajit ja niiden eri

kasvuvaiheet kestävät lämpöä eri määrän. Kasvavat bakteerit tarvitsevat 10 minuutin autoklavoinnin 60-70°C:ssa, kun taas bakteerin itiöt tarvitsevat 2-800 minuutin 100°C:en tai 0,5-12 minuutin 121°C:en autoklavoinnin. Yleisin autoklavointilämpötila on 121°C ja autoklavointiaika 15 minuuttia. (Sojakka – Välimäki 2011: 30-32, 36-37.)

Aslanzadeh (2004) mainitsee artikkelissaan että kaikissa huoneissa tulee olla omat tarvittavat välineet kuten käsineet, pipetit sekä aerosolivapaat pipetin kärjet ja huoneissa käytetyt tavarat tulee toimittaa suoraan kyseiseen huoneeseen. Tämä pätee etenkin puhtaan huoneen käyttötavaroihin. Käyttötavaroita voidaan desinfioida samoilla desinfiointiaineilla kuin erilaisia laboratoriopintoja. Tämän lisäksi käyttötavaroita voidaan puhdistaa pintojen tapaan UV-valolla sekä autoklaavin avulla.

Gefrides ym. (2010) vertailivat pitkäkestoisen autoklavoinnin ja UV-valon tehokkuutta poistaa DNA:ta kuivasta syljestä. Tutkijat kirjoittavat, että laboratorioissa käytetään UV-valoa ja autoklavointia ensisijaisesti tappamaan mikro-organismeja eikä niinkään eliminoidaan DNA:ta. Tutkimuksen tarkoituksena oli nimenomaan tutkia UV-valon ja autoklavoinnin tehokkuutta DNA:n poistamiseen. Sekä UV-valon (2400) että autoklavoinnin (121°C) tehokkuutta mitattiin altistamalla sylkeä sisältäviä putkia 0, 60, 120 ja 180 minuutin ajanjaksoissa sekä UV-valossa että autoklaavissa. Altistuksen jälkeen syljistä eristettiin DNA, joka määritettiin kaupallisella kitillä. Tutkimustuloksissa huomattiin, että autoklavoinnin tehokkuus kontaminaation vähenemiseen parani ajan myötä; 120 minuutin autoklavointi poisti suurimmasta osasta sylkeä kaiken DNA:n. Tutkijat ehdottavatkin, että autoklavoitava tavara tulisi altistaa suoraan autoklaavin höyrylle 120 minuutiksi, ilman mitään sterilisaatiopussia. UV-valon tehokkuus parani, mitä lähempänä ja mitä suurempi määrä UV-valoa putkille annettiin. Kontaminaatiot saatiin paremmin poistettua, jos putket eivät olleet missään telineessä vaan olivat suoraan alttiina UV-valolle. Vertailtaessa UV-valoa ja autoklavointia, tutkimuksessa todettiin, että autoklavointi on tehokkaampi kuin UV-valo jos kulutustavaroiden pinnat altistuvat suoraan autoklaavin höyrylle. Autoklavointi pystyy myös poistamaan pienempiä DNA fragmentteja (<200bp) paremmin kuin UV-valo, jonka takia autoklavointi tulisi valita ennemmin kuin UV-valo, mikäli mahdollista. Tutkijat kehottavat tutkivia laboratorioita testaamaan omat dekontaminaatiomenetelmät käyttämällä kuivaa sylkeä näyttemateriaalina, sillä on helpompi tuhota tuoretta sylkeä tai puhdistettua DNA:ta, ja kulutustavarat sisältävät todennäköisemmin nimenomaan kuivia soluja.

Bonne ym. (2008) tutkimuksessa vertailtiin neljää eri dekontaminaatiomenetelmää, joilla näytteenkäsittelyssä käytettyjä leikkausinstrumenteja voitaisiin desinfioida. Tutkimuksessa testattiin 1) upottamalla desinfiointava väline kokonaan VirkonS-liuokseen 30 minuutiksi, jonka jälkeen välinettä huuhdeltiin kraanaveden alla yhden tunnin ajan, 2) upottamalla desinfiointava väline kokonaan valkaisuaineeseen 20 minuutiksi, jonka jälkeen välinettä huuhdeltiin kraanaveden alla 20 minuuttia, 3) puhdistamalla desinfiointava väline kaupallisella valkaisuaineella, huuhtelemalla vedellä ja upottamalla sen jälkeen väline 100%:in etanolia sekä 4) liekittämällä desinfiointavaa välinettä Bunsenin liekittäjällä. Tutkimustuloksena saatiin, että toimivin ja käytännöllisin menetelmä oli se, että desinfiointavaa välinettä puhdistettiin ensin kaupallisella valkaisuaineella, jonka jälkeen sitä huuhdeltiin kraanavedellä sekä tämän jälkeen 100% etanolilla ja annettiin ilmakeuivua. Tutkijat kirjoittavat, että tämä menetelmä on helppo, halpa ja suhteellisen nopea.

4.4 Reagenssit ja laitteet

Patel ym. (2012) osana tutkimustaan kokeilivat erilaisia tapoja poistaa bakteerin DNA-jäämiä reagensseista. Erilaisia keinoja joita testattiin olivat Sau3AI:lla hajottaminen sekä ultrasuodattaminen, jotka tehtiin suoraan master mixiin, vaihtoehtoisten polymeraasien kokeileminen sekä EMA ja valoaktivointi –käsittely. Sau3AI:n ja ultrasuodattamisen tehot olivat puutteellisia poistamaan bakteerin DNA jäämiä ja vaihtoehtoisilla polymeraaseilla DNA jäämien määrät vaihtelivat arvaamattomasti. Oikealla määrällä EMA:a ja optimaalisella määrällä valoaktivointia saatiin poistettua kaikki bakteerin DNA-jäämät master mixista. Yhtä vaihtoehtoa (8-metyloxypsoralen + UV-valo) tutkijat eivät edes halunneet testata, sillä aiemmat tutkimukset osoittivat tämän menetelmän heikentävän PCR:n herkkyyttä. Testatuista menetelmistä EMA-käsittelyä käytettiin tutkimuksessa jatkossa. Tutkijat toteavat tutkimuksessaan, että 16S PCR:n käyttäminen ilman reagenssien dekontaminaation määrittämistä on hyvin vahingollista. Tutkijat toteavat tosin, että EMA-käsittely ei ole välttämättä toimiva menettely DNA:n eristämiseen tarkoitettujen laitteiden reagenssien vaan vain nimenomaan master mixien dekontaminaatioon.

Corless ym. (2000) kokeilivat tutkimuksessaan erilaisia menetelmiä, joilla kontaminaatioita saataisiin poistettua PCR:ssä käytetystä *Taq*-polymeraasista. Tutkijat testasivat UV-valoa yksinään, 8-MOP:a UV-valon kanssa ja DNAasi I entsyymiä sekä restriktioentsyymiä yhdessä ja erikseen. Dekontaminaatiomenetelmien haittapuolena oli

usein menetelmän merkittävä herkkyuden väheneminen. Paras dekontaminaatiomenetelmä tutkimuksen pohjalta oli DNAasi I entsyymi, tosin sekin vaikutti *Taq* DNA polymeraasin aktiivisuuteen. Tutkijat toteavatkin, että ilman ultrapuhtaan *Taq* DNA polymeraasin, ultrapuhtaiden reagenssien ja DNA-vapaiden muovitavaroiden kehittämistä, herkkä 16S rRNA menetelmä, esimerkiksi TaqMan systeemillä tehtynä, tulee jatkossakin olemaan ongelmallinen kontaminaatioiden suhteen.

Gefrides ym. (2010) toteavat tutkimuksessaan, että laboratoriot ostavat usein DNA-vapaita tai steriilejä kulutustavaroita ilman minkäänlaista dekontaminaatiokäsittelyä. Tutkijat ehdottavatkin tutkimuksessaan, että laboratoriot voisivat suorittaa laatukontrollitestejä kaupallisille tavaroille ja reagensseille ennen käyttöä, varmistaakseen että ne ovat DNA-vapaita. Kyseisenlainen toimintatapa voi tosin olla haastava, sillä kontaminaatiot kulutustavaroissa ovat yleensä satunnaisia. On epätodennäköistä, että koko reagenssin LOT-erä tai edes suurin osa erästä olisi kontaminoitunut. Todennäköisempää on, että kontaminaatiota on pienessä osassa erää vaihtelevin määrin.

5 Tutkimuksen tarkoitus, tutkimuskysymykset ja tavoite

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, mitä kontaminaatiolöydöksiä klinisen bakteriologian PCR-laboratorion YB-PCR:ssä on löytynyt, miten kontaminaatiolajien löydösmäärät ovat muuttuneet ja minkälaisia toiminnan muutoksia PCR-laboratoriossa on tehty vuosien 2010-2013 aikana. Tarkoituksena on myös selvittää, onko jollakin tehdyllä toiminnan muutoksella yhteyttä jonkin kontaminaatiolajin määrän muuttumiseen. Opinnäytetyön tavoitteena on lisätä ymmärrystä kontaminaatioiden ehkäisemiseen bakteriologian laboratoriossa ja antaa lisätukea tulevaisuudessa päätöksien tekemiseen, kun mietitään toimintatapojen kehittämistä PCR-työskentelyssä. Kun tietämys kontaminaatioiden aiheuttajiin ja niiden ehkäisemiseen lisääntyy, voidaan jatkossa mahdollisesti vähentää lisätöistä aiheutuvia kustannuksia, joita tulee kun kontaminaation aiheuttajaa pyritään selvittämään. Tiedon kerääntymisen myötä tavoitteena on kustannuksien vähentäminen ja henkilökunnan työajan tehokkaampi hyödyntäminen.

Tutkimuskysymykset ovat:

- 1) Mitä eri kontaminaatiolajeja on ollut vuosien 2010-2013 välisenä aikana?
- 2) Miten eri kontaminaatiolöydöslajien määrä on muuttunut vuosien 2010-2013 välisenä aikana?
- 3) Minkälaisia toiminnan muutoksia PCR-työskentelyssä on tehty vuosien 2010-2013 välisenä aikana?
- 4) Minkälainen yhteys kontaminaatiolöydöslajien määrän muuttumisella on toiminnan muutoksiin?

6 Aineiston kerääminen ja analysointimenetelmät

Aineisto opinnäytetyöhön kerättiin potilastietojärjestelmästä, erilaisista dokumenteista ja niitä analysoitiin sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti (Taulukko 1).

Taulukko 1. Opinnäytetyön tutkimuskysymykset, aineiston keräys- ja analyysimenetelmät.

| KYSYMYKSET | AINESTON KERÄYS | AINESTON ANALYYSI |
|--|--|--|
| 1. Mitä eri kontaminaatiolajeja on ollut vuosien 2010-2013 välisenä aikana? | Laboratorion potilastietojärjestelmä | Kvantitatiivinen: frekvenssit |
| 2. Miten eri kontaminaatiolöydöslajien määrä on muuttunut vuosina 2010-2013 aikana? | Laboratorion potilastietojärjestelmä | Kvantitatiivinen: frekvenssit ja prosentuaaliset osuudet |
| 3. Minkälaisia toiminnan muutoksia PCR-työskentelyssä on tehty vuosien 2010-2013 aikana? | Erilaiset dokumentit: PCR-päiväkirjat, sähköpostit, PCR-kokousmuistiot, laboratorion potilastietojärjestelmä | Kvalitatiivinen: toiminnan muutokset luokitellaan ja kuvaillaan |
| 4. Minkälainen yhteys kontaminaatiolöydösten määrän muuttumisella on toiminnan muutoksiin? | Edellämainitut, käytetään hyödyksi aiemmin laskettuja frekvenssejä ja prosentuaalisia määriä | Kvantitatiivinen, yhteysien löytäminen kontingenssikertoimen ja khii toiseen -riippumattomuustestin avulla |

Aineisto vuosilta 2010-2013 kontaminaatioiksi luokitelluista potilasnäytetuloksista kerättiin laboratorion potilastietojärjestelmästä. Tiedot kerättiin ennalta laadittuun Excel-tilukseen. Yhteensä läpikäytyjä näytteitä oli 5045 kappaletta. Jokainen näyte käytiin

yksi kerrallaan läpi, ja näytteen muistilapulta tarkistettiin ensinnäkin, oliko kyseinen näyte ollut positiivinen YB-PCR:ssä ja toisekseen oliko löydös luokiteltu kontaminaatioksi. Jokainen kontaminaatiolajilöydös kirjattiin ylös ennalta tehtyyn Excel-taulukoon kuukausittain. Löydös kirjattiin sen kuukauden kohdalle, jonka aikana kyseinen näyte oli käsitelty. 298 näytteen muistilappumerkinnästä ei selvinnyt, oliko kyseessä kontaminaatiolöydös vai vaan heikkolaatuinen sekvenssi, jolloin löydöstä ei oltu saatu nimettyä. Nämä 298 näytettä tarkistettiin käymällä läpi sekvenssien paperiversiot, joista tarkistettiin oliko sekvenssin laatu heikkolaatuista vai oliko löydös pystytty nimeämään, mutta sitä ei oltu kirjoitettu näytteen muistilapulle. 188 näytteen kohdalla sekvenssi oli huonolaatuista, jolloin analysointia nimen saamiseksi ei voitu tehdä ja näyte oli tulkittu negatiiviseksi. 18 näytteen sekvenssiä ei löytynyt. 38 näytteen kohdalla löydös oli saatu nimettyä, ja nämä kontaminaatiolöydökset lisättiin opinnäytetyössä löydettyihin kontaminaatioihin. 54 näytteen kohdalla sekvenssin uusinta-analyysi olisi kannattanut tehdä, mutta tämä olisi aiheuttanut kustannuksia, joten näiden näytteiden kohdalla jää epäselväksi oliko kyseessä kontaminaatiolöydös. Aineistoa kerätettäessä kirjattiin myös ylös, kuinka monta näytettä YB-PCR:än oli tullut minäkin kuukautena. Vuosina 2010-2013 kyseiseen työjonoon laitettiin myös muiden tutkimusten näytteitä, joten nämä vähennettiin lopullisesta näytemäärästä. Kontaminaatiolöydösmäärien ja kaikkien YB-PCR-näytteiden määrien avulla voitiin laskea eri kontaminaatiolajien prosentuaaliset osuudet koko YB-PCR-näytemäärästä.

Aineistoa viimeisten neljän vuoden aikana tehdyistä toimintatapojen muutoksista PCR-laboratoriossa kerättiin PCR-laboratorion vastuuhihmisten välisistä sähköposteista, potilastietojärjestelmän muistilapuilta, PCR-laboratorion päiväkirjasta, PCR-laboratorion kokousmuistioista ja PCR-laboratorion toiminnan muutos-päiväkirjasta. Potilastietojärjestelmän muistilappuja oli yhtä paljon, kuin näytteitä käytiin lävitse eli 5045 kpl, kokousmuistioita oli 29 kpl ja sähköposteja käytiin läpi 487 kpl. Näistä erilaisista dokumenteista selvisivät tehdyt muutokset sekä ajankohdat, jolloin muutokset olivat tehty. Eri muutokset jaoteltiin samaan tapaan, kuin kontaminaatiolähteet aiemmin eli ympäristöön, henkilökuntaan, käyttötavaroihin sekä reagensseihin ja laitteisiin. Dokumenteista kerättiin aluksi kaikki muutokset ylös, jonka jälkeen muutokset sijoitettiin johonkin neljään aiempaan mainittuun kategoriaan (ks. sivu 6). Alla on kuvattuna esimerkin avuin, kuinka toiminnan muutosten aineistoa on luokiteltu eri kategorioihin.

Esimerkki ympäristöön liittyvästä toiminnan muutoksesta: toiminnan muutos-päiväkirjassa luki 28.11.2011, että puhtaan huoneen toiminta siirretään väistötilaan.

Opinnäytetyön aiempien perusteluiden mukaan, muutokset jotka liittyvät huoneiden tilamuutoksiin, sijoitetaan ympäristöön liittyviin kontaminaatiolähteisiin. Teoreettinen ajatus tämän takana on se, voisiko käytössä olevan huoneen pinnoilla tai ilmassa olla mahdollisesti DNA-jäämiä, jotka aiheuttaisivat kontaminaatiota. Jos näin olisi, olisi tilamuutoksen myötä nähtävissä, että mahdollinen kontaminaatio häviäisi.

Esimerkki henkilökuntaan liittyvästä toiminnan muutoksesta: toiminnan muutospäiväkirjassa luki 21.11.2011, että PCR-henkilökunta alkaa siivota PCR-tilat. Aiempien perusteluiden mukaan tämä muutos kuuluu henkilökuntaan liittyviin kontaminaatiolähteisiin, sillä muutokset jotka liittyvät henkilökuntavaihdoksiin, sijoitetaan kyseiseen kategoriaan. Ajatuksena on se, voisiko kontaminaatiota aiheuttaa henkilö, joka ei tee itse PCR:ä eikä näin ollen osaa ottaa huomioon menetelmän kontaminaatioherkyyttä tarpeeksi hyvin. Jos näin olisi, olisi henkilökuntavaihdoksen myötä nähtävissä, että mahdollinen kontaminaatio häviäisi.

Esimerkki käyttötavaroihin liittyvästä toiminnan muutoksesta: toiminnan muutospäiväkirjassa luki 18.5.2012, että näytekäsittelyhuoneessa otetaan käyttöön uusi siivousohje käyttötavaroille. Aiempien perusteluiden mukaan tämä muutos kuuluu käyttötavaroihin liittyviin kontaminaatiolähteisiin, sillä muutokset, jotka liittyvät käyttötavaroihin riittämättömään desinfiointiin, kuuluvat tähän kategoriaan. Huonosti desinfioidut käyttötavarat voivat olla yksi kontaminaatiolähde PCR:ssä.

Esimerkki reagensseihin ja laitteisiin liittyvästä toiminnan muutoksesta : sähköpostissa luki 2.1.2013, että YB-PCR-näytteiden eristyksessä käytetään aina vatedes TE-puskuria. Aiempien perusteluiden mukaan tämä muutos kuuluu reagensseihin ja laitteisiin, sillä muutokset jotka liittyvät esimerkiksi reagenssien vaihtamiseen, kuuluvat tähän kategoriaan. TE-puskurissa mahdollisesti oleva bakteerin DNA-jäämä voi aiheuttaa kontaminaatioita.

Kun toiminnan muutokset oli luokiteltu neljää eri kategoriaan, tehtiin kategorioista omat taulukot, joihin tehdyt muutokset kirjattiin aikajärjestyksessä. Taulukoista nähdään mihin kategoriaan muutos kuuluu, toiminnan muutoksen päivämäärä ja koodi, joka rakentuu lyhennelmästä ja juoksevista numerosta. Esimerkiksi ympäristöön liittyvät toiminnan muutokset ovat koodattu Y1-Y13. Taulukoissa nähdään myös lyhyesti, mikä kyseinen toiminnan muutos on ollut. Taulukoiden jälkeen toiminnan muutokset ovat kuvattu tarkemmin.

Toiminnan muutoksen ja kontaminaatiolajin määrän muutosta selvitettiin ristiintaulukoinnilla, kontingenssikertoimella ja khii toiseen –riippumattomuustestillä. Ristiintaulukoinnilla tutkija haluaa selvittää kahden luokitellun muuttujan välistä yhteyttä (Heikkilä 2004: 210). Kontingenssikerroin on yksi korrealaatiokertoimista. Kontingenssikerroin sopii luokitteluasteikollisille muuttujille, joten se sopii käytettäväksi tähän opinnäytetyöhön. Luokitteluasteikolliset muuttujat voidaan jakaa eri ryhmiin, mutta muuttujia ei voida asettaa mihinkään järjestykseen. Toisin sanoen kahdesta tilastoyksiköstä voidaan päätellä vain se, kuuluvatko muuttujat samaan luokkaan vai eivät. (Valli 2001: 21, 60; Holopainen – Pulkkinen 2002: 15.) Ristiintaulukoinnin yhteydessä halutaan usein selvittää, onko sarake- ja rivimuuttujien välillä riippuvuutta. Tällöin testataan, onko kahden muuttujan välillä tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta eli puhutaan ns. merkitsevyystestauksesta. (Heikkilä 2004: 212.) Merkitsevyystestauksen avulla voidaan selvittää, voidaanko saatuja tuloksia yleistää perusjoukkoon. Erilaisia merkitsevyystestejä on useita, jotka jaetaan parametrisiin ja ei-parametrisiin. Luokitteluasteikollisille muuttujille sopii ei-parametriset testit, joista khii toiseen –riippumattomuustesti (X^2) on yksi vaihtoehto. (Valli 2001: 65 71-72.)

Muuttujien välillä on voimakas riippuvuus, jos korrealaatiokerroin on 1 tai -1, mutta jos muuttujien välillä ei ole minkäänlaista riippuvuutta, on kerroin tuolloin lähellä arvoa 0. Jos arvoksi saadaan 1, on korrealaatio voimakkaasti positiivinen, jos saadaan -1, on korrealaatio voimakkaasti negatiivinen. (Heikkilä 2004: 91.). Riippuvuuden lisäksi korrealaatiokertoimien kohdalla tulee aina muistaa kertoa, onko muuttujien välinen riippuvuus positiivinen vai negatiivinen (Valli 2001: 61). Kontingenssikertoimen arvo lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$C = \sqrt{\frac{\chi^2}{N + \chi^2}}$$

Kuvio 1. Kontingenssikertoimen kaava. (KvantiMOTV. 2004.)

Kontingenssikertoimen kaavassa (Kuvio 1) X^2 tarkoittaa testisuureen arvoa ja N havaintojen lukumäärää taulukossa. X^2 testisuureen arvo lasketaan khii toiseen –riippumattomuustestillä. (KvantiMOTV. 2004) Yleensä korrealaatiokertoimen arvo testityypistä riippumatta on -1:n ja 1:n välillä, mutta kontingenssikertoimen arvo jää aina alle 1:n (Valli 2001: 62).

Khii toiseen –riippumattomuustestin kaava:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^R \sum_{j=1}^C \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Kuvio 2. Khii toiseen –riippumattomuustestin kaava. (KvantiMOTV. 2011.)

Khii toiseen –riippumattomuustestin kaavassa O_{ij} = havaittu frekvenssi, E_{ij} = odotettu frekvenssi, R = rivien määrä ja C = sarakkeiden määrä (KvantiMOTV. 2011.)

Sekä kontingenssikerrointa että khii toiseen –riippumattomuustestiä käytettäessä tiettyjen ehtojen tulee täyttyä. Ensinnäkin tutkijan tulee tietää muuttujien todelliset ja odotetut frekvenssit. Odotetun frekvenssin tulee olla jokaisella muuttujalla >5 . Jos näin ei ole, tulee suorittaa Yatesin korjaus. Yatesin korjaus tarkoittaa, että soluihin joiden arvo on alle viisi, lisätään ennen laskemista 0,5. Toisekseen ristiintaulukon jokaisessa ruudussa tulee olla arvo ja pieniä luokkia saa olla korkeintaan 20%. (Valli 2001: 62-63, 74.) Odotettu frekvenssi lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$E_{ij} = \frac{O_{i.} \times O_{.j}}{N}$$

Kuvio 3. Odotetun frekvenssin laskukaava. (KvantiMOTV. 2011.)

Odotetun frekvenssin kaavassa E_{ij} = i:nneen rivin ja j:nneen sarakkeen odotettu frekvenssi, $O_{i.}$ = i:nneen rivin reunajakauma (eli rivin valinneiden vastaajien kokonaissumma), $O_{.j}$ = j:nneen sarakkeen reunajakauma (eli sarakkeen valinneiden vastaajien kokonaissumma) ja N = havaintojen määrä taulukossa (KvantiMOTV. 2011.)

Merkitsevyystestin lisäksi perusjoukosta tutkitaan vielä tehtyjen olettamusten eli hypoteesien paikkansapitävyyttä. Tutkija asettaa tutkittavalle asialle kaksi vaihtoehtoa, joista toinen on nollahypoteesi (H_0) ja toinen vastahypoteesi (H_1). Käytännössä nollahypoteesi on perusolettamus siitä, kuinka asia on. Tutkijan tavoitteena on nollahypoteesin hylkääminen, jolloin vastahypoteesi tulee voimaan. Ennen nollahypoteesin testausta tutkijan tulee päättää, kuinka suuri hylkäämisriski otetaan, jos nollahypoteesi hylätään. Hylkäämisriskin todennäköisyyttä kutsutaan p-arvoksi. (Holopainen – Pulkkinen 2002: 175-177.) Käytetyimmät p-arvot ovat tilastollisesti

melkein merkitsevä ($p=0,05$), tilastollisesti merkitsevä ($p=0,01$) ja tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p=0,001$). Suluissa olevat p-arvot kertovat, millaisen riskin tutkija ottaa, jos hän yleistää saatuja tuloksia perusjoukkoon. (Valli 2001: 71, 75.) Lopullinen p-arvo saadaan khii toiseen –jakaumataulukosta. Tässä opinnäytetyössä on käytetty khii toiseen –jakaumaa Raine Vallin kirjasta (2001: 115). P-arvon määrittämistä varten tarvitaan vapausasteiden määrä. Vapausasteiden määrä lasketaan testissä käytetyn taulukon rivien ja sarakkeiden avulla. Vapausasteiden (va) laskemisen kaava on $va = (\text{rivien määrä} - 1) * (\text{sarakkeiden määrä} - 1)$. (KvantiMOTV. 2011.) Tässä opinnäytetyössä vapausasteiden määrä on aina $(2-1) * (2-1) = 1$.

7 Tulokset

Aluksi käydään läpi, mitä erilaisia kontaminaatiolajeja PCR-laboratoriossa on havaittu vuosien 2010-2013 välisenä aikana. Tämän jälkeen käydään läpi löydös kerrallaan, miten kontaminaatiolajin määrä on muuttunut kuukausittain suhteutettuna YB-PCR-näytteiden määrään. Seuraavaksi käsitellään sitä, mitä erilaisia toiminnan muutoksia PCR-laboratoriossa on tehty vuosien 2010-2013 aikana, ja lopuksi tarkastellaan kontaminaatiolajien määrän muutosten yhteyttä toiminnan muutoksiin.

7.1 Kontaminaatiolöydöslajien ja YB-PCR:n näytteiden määrät

Yhteensä erilaisia kontaminaatiolajilöydöksiä YB-PCR:ssä vuosien 2010-2013 aikana oli 41 kappaletta (Taulukko 2). Joukossa oli paljon yksittäisiä tai vain muutamia löydöksiä jollekin kontaminaatiolajille. Vuonna 2010 kontaminaatiolöydöksiä oli kymmenen kappaletta (2 % kaikista YB-PCR:än sinä vuonna tulleista näytteistä), eniten löytyi Ralstonia-lajia kuusi kappaletta koko vuoden aikana. Määrällisesti vuonna 2013 kontaminaatiolöydöksiä on ollut eniten, mutta vuonna 2013 on tullut eniten myös näytteitä YB-PCR:än. Vuosien 2012 ja 2013 kontaminaatiolöydösten %-osuus kaikista YB-PCR:än tulleista näytteistä on lähes yhtä suuri, vuonna 2012 13,8 % ja vuonna 2013 14,2 %. Vuonna 2011 kontaminaatiolöydösten osuus oli 11,2 %.

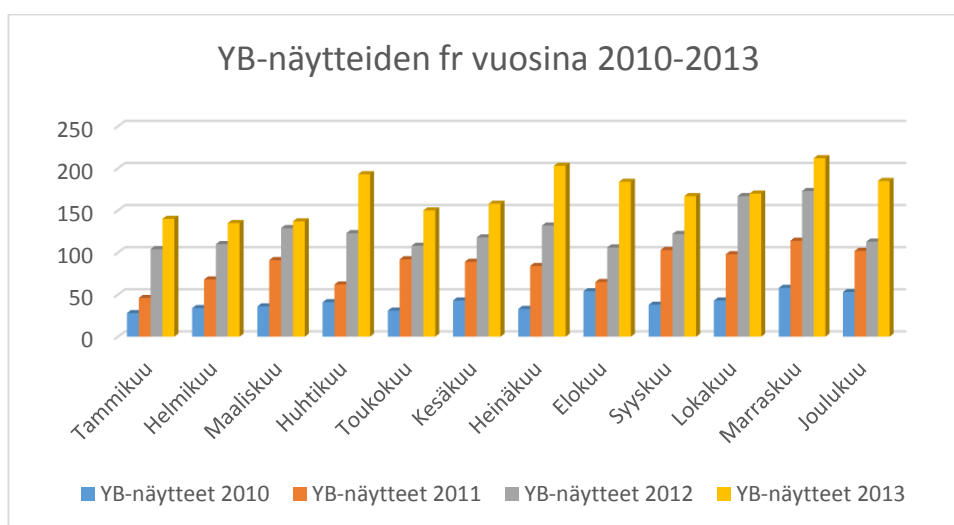
Taulukko 2. Kontaminaatiolöydökset YB-PCR:ssä vuosien 2010-2013 välisenä aikana.

| | Kontaminaatiolöydös | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | Yhteensä |
|----|-------------------------------------|-------|--------|--------|--------|----------|
| 1 | Acidovorax sp. | 0 | 6 | 5 | 26 | 37 |
| 2 | Acinetobacter sp. | 0 | 4 | 34 | 3 | 41 |
| 3 | Aquabacterium sp. | 0 | 0 | 5 | 4 | 9 |
| 4 | Agrobacterium sp. | 0 | 0 | 0 | 62 | 62 |
| 5 | Arthobacter sp. | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 |
| 6 | Bacillus sp. | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 7 | Bergeyella sp. | 0 | 10 | 2 | 0 | 12 |
| 8 | Burkholderias sp. | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| 9 | Chelatococcus sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 10 | Chryseobacterium sp. | 0 | 14 | 4 | 1 | 19 |
| 11 | Cloacibacterium sp. | 0 | 7 | 1 | 1 | 9 |
| 12 | Comamonadaceae sp. | 0 | 3 | 3 | 0 | 6 |
| 13 | Corynebacterium sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 14 | Cronobacter sp. | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 15 | Cupriavidus sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 16 | Dermacoccus sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 17 | Diaphrobacter sp. | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 18 | Dietzia sp. | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 19 | Eikenella sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 20 | Elizabethkingia sp. | 0 | 14 | 2 | 0 | 16 |
| 21 | Flavobacter sp. | 0 | 14 | 4 | 1 | 19 |
| 22 | Gallibacterium sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 23 | Janibacter sp. | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 24 | Leptotrichia sp. | 0 | 1 | 5 | 3 | 9 |
| 25 | Methylobacterium sp. | 0 | 2 | 1 | 43 | 46 |
| 26 | Mezorhizobium sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 27 | Mogibacterium sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 28 | Mycobacter sp. | 0 | 1 | 16 | 1 | 18 |
| 29 | Nocardia sp. | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 30 | Planococcus sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 31 | Propionibacter sp. | 2 | 13 | 0 | 4 | 19 |
| 32 | Pseudomonas sp. | 2 | 1 | 58 | 91 | 152 |
| 33 | Ralstonia sp. | 6 | 3 | 2 | 0 | 11 |
| 34 | Riemerella sp. | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 35 | Rhizobium sp. | 0 | 0 | 0 | 21 | 21 |
| 36 | Rhodobacter sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 37 | Rhodococcus sp. | 0 | 1 | 31 | 0 | 32 |
| 38 | Slackia sp. | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 39 | Sphingobium sp. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 40 | Sphingomonas sp. | 0 | 3 | 18 | 20 | 41 |
| 41 | Streptomyces sp. | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| | Kontaminaatiolöydöksiä yhteensä | 10 | 114 | 208 | 288 | |
| | YB-PCR:än tulleet näytteet yhteensä | 492 | 1014 | 1505 | 2034 | |
| | Kontaminaatiolöydösten %-osuus | 2,0 % | 11,2 % | 13,8 % | 14,2 % | |

YB-PCR:ään tulleiden näytteiden määrä on noussut joka vuosi. Vuonna 2010 näytteitä tuli yhteensä 492 kpl, vuonna 2011 1014 kpl, vuonna 2012 1505 kpl ja vuonna 2013 2034 kpl (Taulukko 3 ja Kuvio 4).

Taulukko 3. YB-PCR:än tulleiden näytteiden määrät vuosina 2010-2013.

| Kuukausi | YB-näytteet 2010 | YB-näytteet 2011 | YB-näytteet 2012 | YB-näytteet 2013 |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Tammikuu | 28 | 46 | 104 | 140 |
| Helmikuu | 34 | 68 | 110 | 135 |
| Maaliskuu | 36 | 91 | 129 | 137 |
| Huhtikuu | 41 | 62 | 123 | 193 |
| Toukokuu | 31 | 92 | 108 | 150 |
| Kesäkuu | 43 | 89 | 118 | 158 |
| Heinäkuu | 33 | 84 | 132 | 203 |
| Elokuu | 54 | 65 | 106 | 184 |
| Syyskuu | 38 | 103 | 122 | 167 |
| Lokakuu | 43 | 98 | 167 | 170 |
| Marraskuu | 58 | 114 | 173 | 212 |
| Joulukuu | 53 | 102 | 113 | 185 |
| Yhteensä | 492 | 1014 | 1505 | 2034 |



Kuvio 4. YB-PCR:n näytemäärät vuosina 2010-2013.

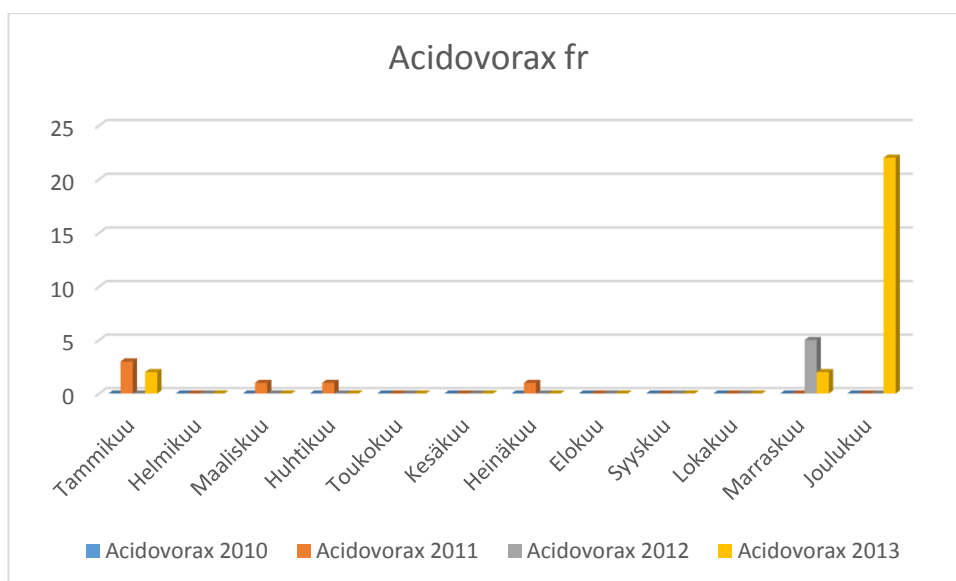
7.2 Kontaminaatiolöydösmäärien muutokset YB-PCR:ssä kuukausittain

Kontaminaatiolöydöslajien määrät laskettiin jokaiselle kuukaudelle. Kontaminaatiolöydöslajien prosentuaaliset määrät laskettiin suhteutettuna saman kuukauden aikana tulleiden YB-PCR-näytteiden määrään. Löydetystä

kontaminaatiolajeista, joita oli määrällisesti koko neljän vuoden aikana ≤ 10 kpl, ei ole tehty kuvaajia eikä laskettu prosentuaalisia määriä. Mitä todennäköisemmin näin pienille löydösmääriille ei voida löytää mitään yksiselitteistä muuttujaa, joka kertoisi, onko jollakin toiminnan muutoksella yhteyttä kyseisten kontaminaatiolajien määrän muuttumiseen. Tämän vuoksi päätettiin, että kyseisistä kontaminaatiolajeista ei ole myöskään tarvetta tehdä kuvaajia. Kyseisiä kontaminaatiolajeja oli 26 kappaletta: *Arthobacter* sp., *Aquabacterium* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderias* sp., *Chelatococcus* sp., *Cloacibacterium* sp., *Comamonadaceae* sp., *Corynebacterium* sp., *Cronobacter* sp., *Cupriavidus* sp., *Dermacoccus* sp., *Diaphrobacter* sp., *Dietzia* sp., *Eikenella* sp., *Gallibacterium* sp., *Janibacter* sp., *Leptotrichia* sp., *Mezorhizobium* sp., *Mogibacterium* sp., *Nocardia* sp., *Planococcus* sp., *Riemerella* sp., *Rhodobacter* sp., *Slackia* sp., *Sphingobium* sp. ja *Streptomyces* sp. Prosentuaalisten määrien laskeminen sekä kuvaajat tehtiin lopulta 15 löydöslajista, joiden määrä vuosina 2010-2013 oli yhteensä >10 kpl. Nämä kontaminaatiolöydöslajit olivat *Acidovorax* sp., *Acinetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Bergeyella* sp., *Chryseobacterium* sp., *Elizabethkingia* sp., *Flavobacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodococcus* sp. ja *Sphingomonas* sp.

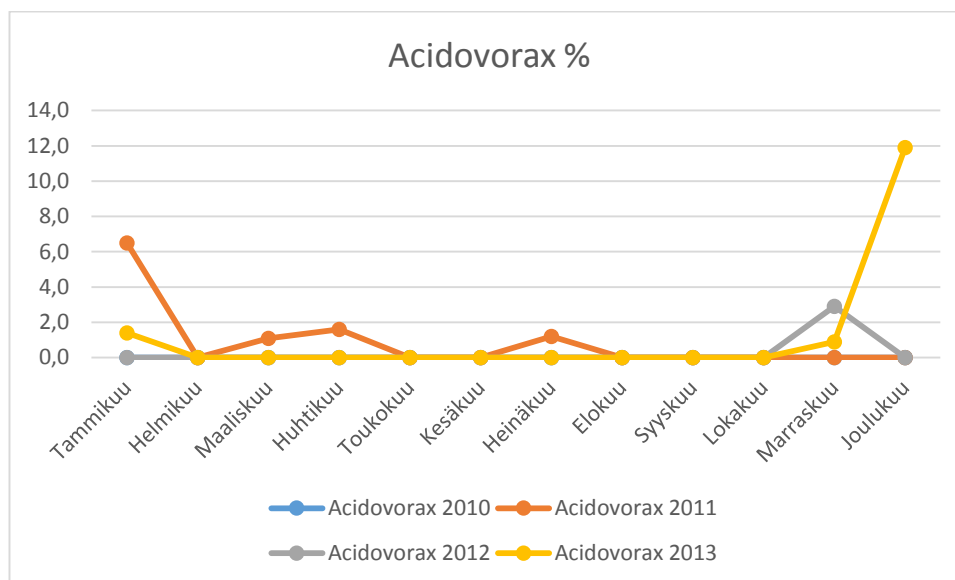
1. *Acidovorax* sp.

Vuoden 2013 joulukuussa *Acidovorax*-lajin kontaminaatiolöydösten määrä oli suurimmillaan, yhteensä 22 kpl. Vähäisiä löydösmääriä oli vuosien 2011 tammikuussa (3 kpl) ja 2013 tammikuussa (2 kpl), vuoden 2011 maaliskuussa (1 kpl), huhtikuussa (1 kpl) ja heinäkuussa (1 kpl) sekä vuoden 2012 marraskuussa (5 kpl) (Kuvio 5).



Kuvio 5. Acidovorax-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

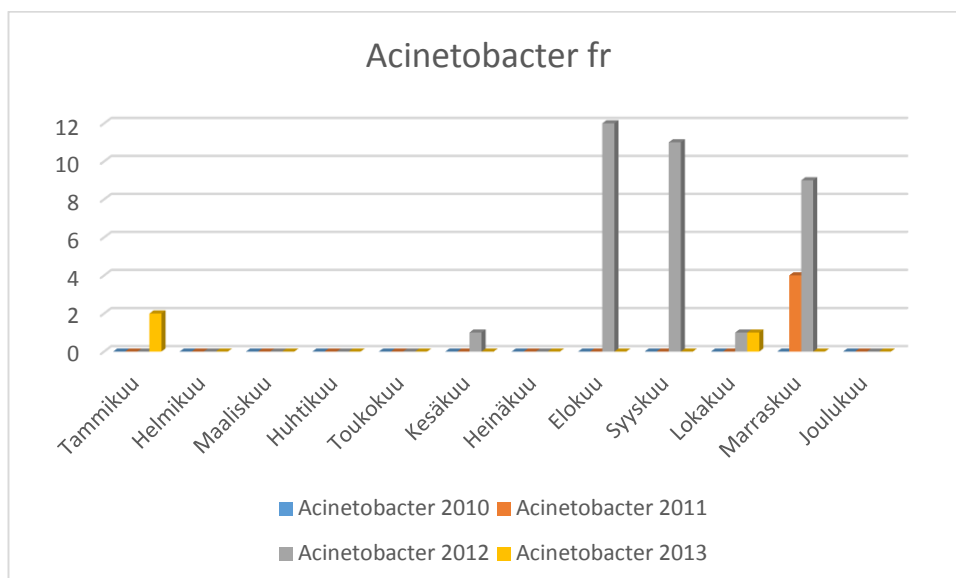
Vuoden 2013 joulukuussa Acidovorax-lajin löydösten määrä kokonaisnäytemäärästä oli 11,9%. Muina kuukausina löydöksiä oli alle 10% kokonaisnäytemäärästä (Kuvio 6).



Kuvio 6. Acidovorax-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

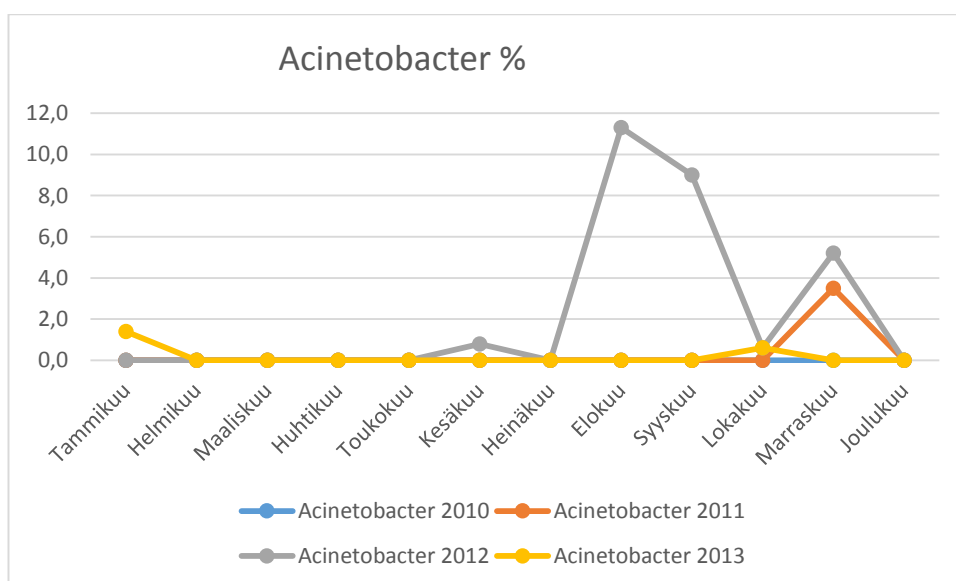
2. Acinetobacter sp.

Acinetobacter-lajin suurimmat löydösmäärät olivat vuoden 2012 elokuussa (12 kpl), syyskuussa (11 kpl) ja marraskuussa (9 kpl). Vähäisiä löydösmääriä oli vuonna 2013 tammikuussa (2 kpl) ja lokakuussa (1 kpl), vuonna 2011 marraskuussa (4 kpl) sekä vuoden 2012 kesäkuussa (1 kpl) (Kuvio 7).



Kuvio 7. Acinetobacter-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

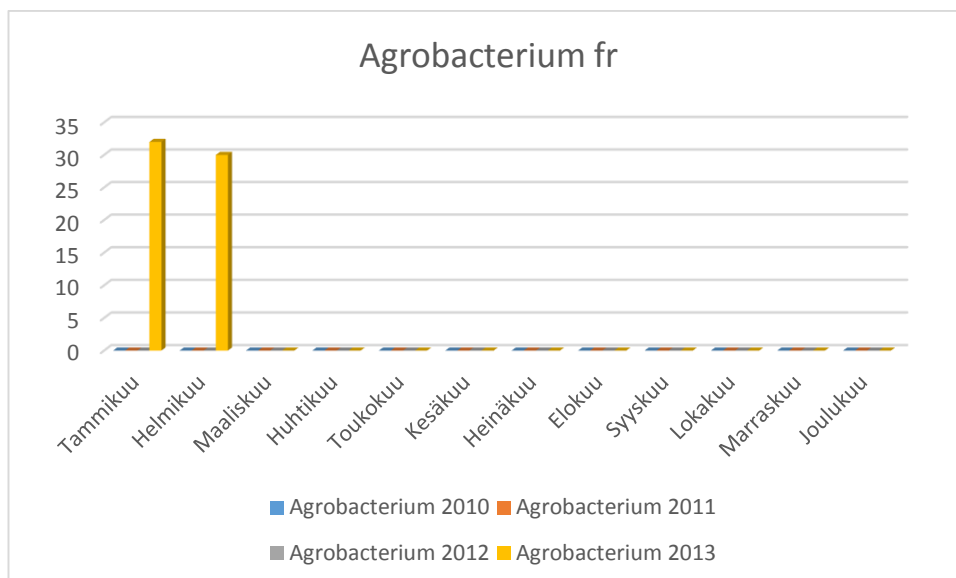
Vuoden 2012 elokuussa Acinetobacter-lajin löydöksiä oli 11,3% ja saman vuoden syyskuussa 9,0 %. Vuoden 2012 kesä- ja marraskuussa, vuoden 2011 marraskuussa sekä vuoden 2013 tammi- ja lokakuussa prosentuaaliset määrät olivat $\leq 5,2$ % (Kuvio 8).



Kuvio 8. Acinetobacter-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

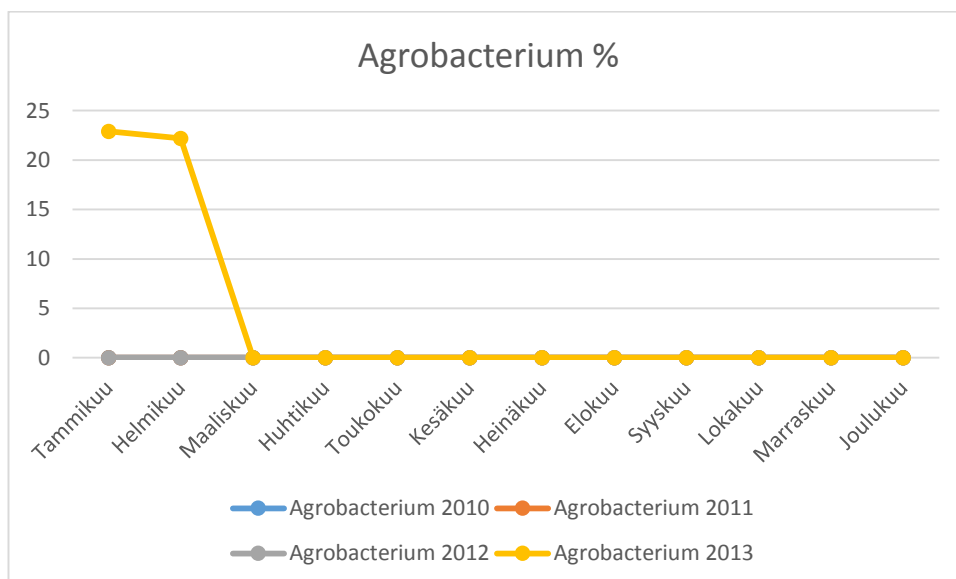
3. Agrobacterium sp.

Agrobacterium-lajia löytyi vuoden 2013 tammi- ja helmikuussa. Tammikuussa löytyi 32 kpl ja helmikuussa 30 kpl (Kuvio 9).



Kuvio 9. Agrobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

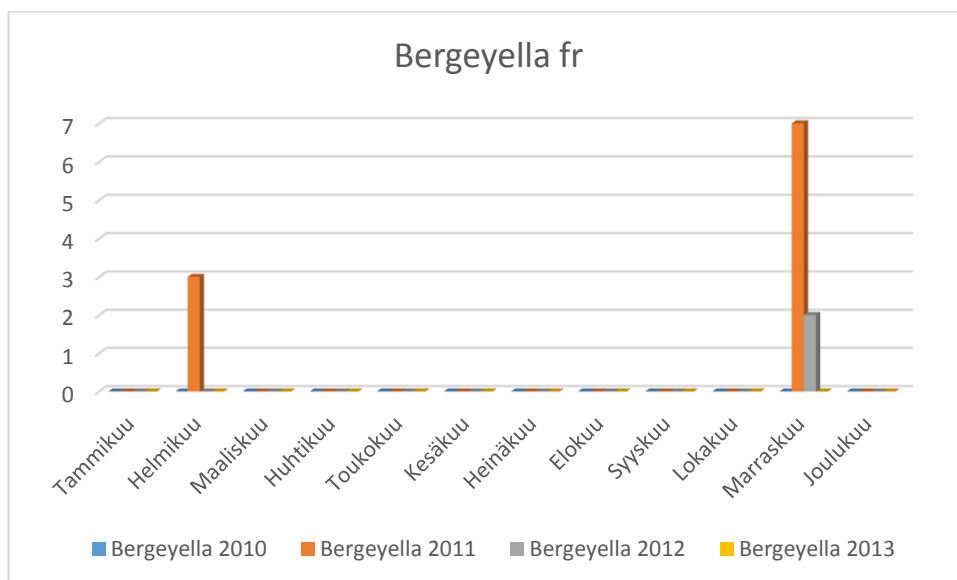
Vuoden 2013 tammikuussa Agrobacterium-lajia oli 22,9 % koko kuukauden näytemäärästä ja saman vuoden helmikuussa 22,2 % (Kuvio 10).



Kuvio 10. Agrobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

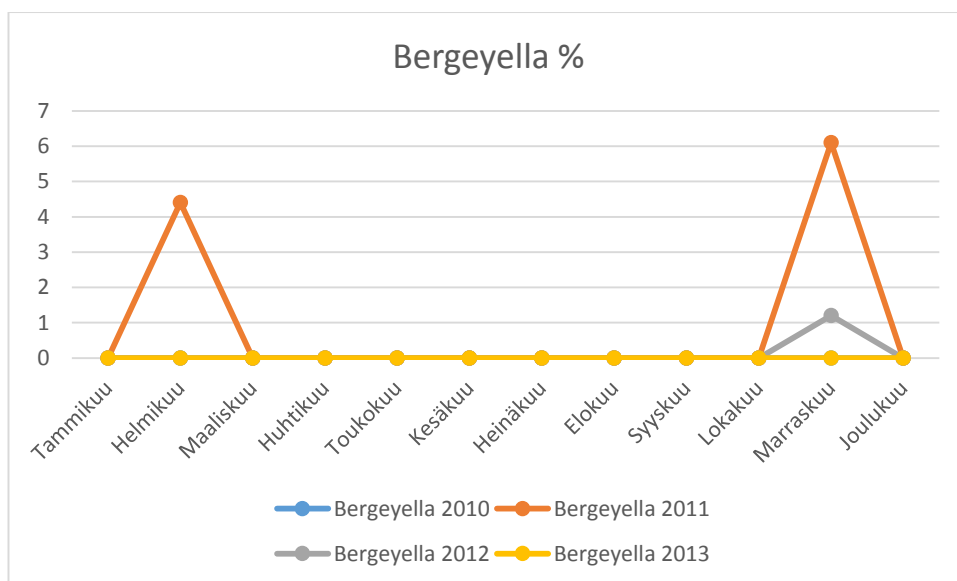
4. Bergeyella sp.

Bergeyella-lajia löytyi vuoden 2011 helmi- ja marraskuussa sekä vuoden 2012 marraskuussa. Helmikuussa löytyi 3 kpl, vuoden 2011 marraskuussa 7 kpl ja vuoden 2012 marraskuussa 2 kpl (Kuvio 11).



Kuvio 11. Bergeyella-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

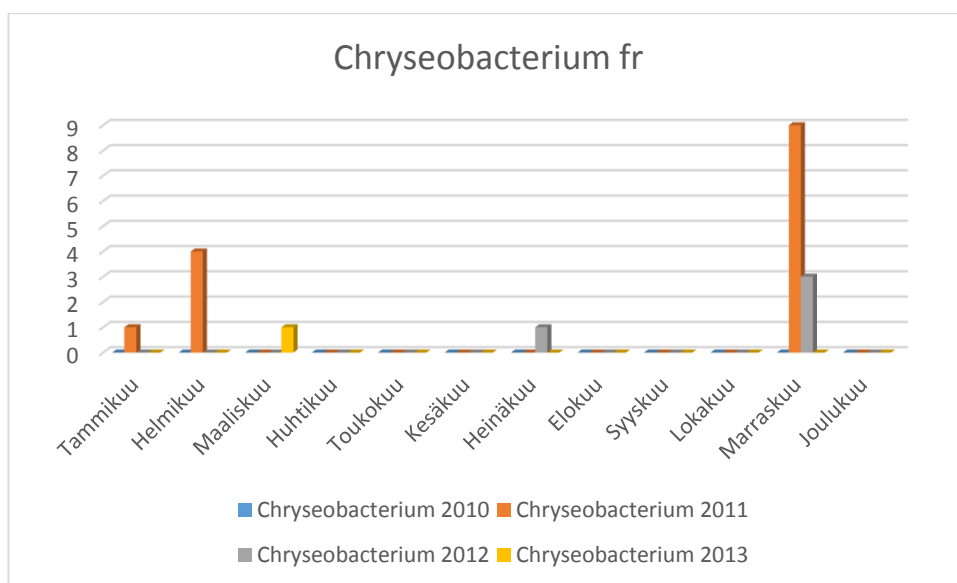
Prosentuaalisesti kokonasinäytemäärästä Bergeyella-lajia löytyi vuoden 2011 marraskuussa (6,0 %). Vuoden 2011 helmikuussa osuus oli 4,4 % ja vuoden 2012 marraskuussa 1,2 % (Kuvio 12).



Kuvio 12. Bergeyella-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

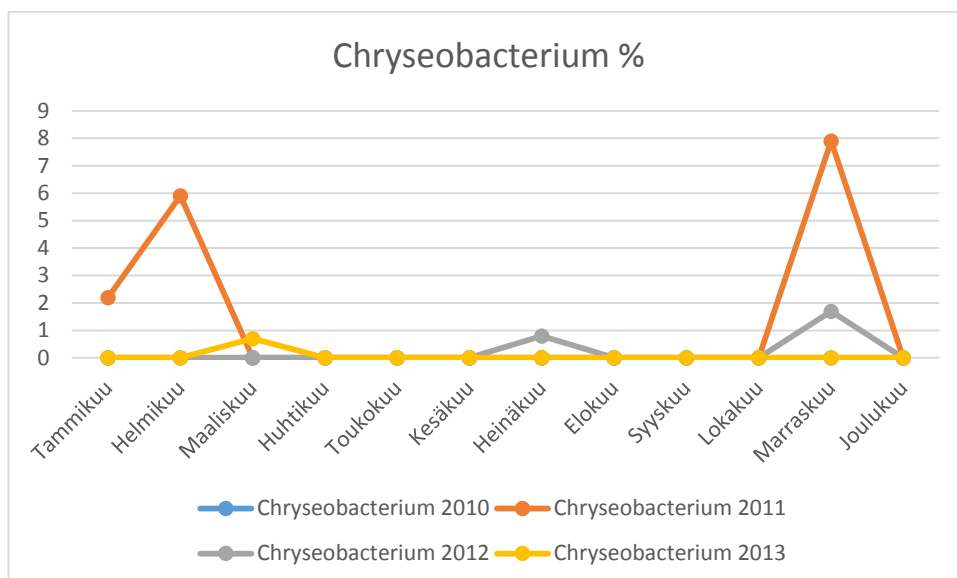
5. Chryseobacterium sp.

Chryseobacterium-lajia löytyi vuoden 2011 tammikuussa 1 kpl, helmikuussa 4 kpl ja marraskuussa 9 kpl. Vuoden 2012 heinäkuussa löytyi 1 kpl ja marraskuussa 3 kpl. Vuoden 2013 maaliskuussa Chryseobacterium-lajia löytyi 1 kpl (Kuvio 13).



Kuvio 13. Chryseobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

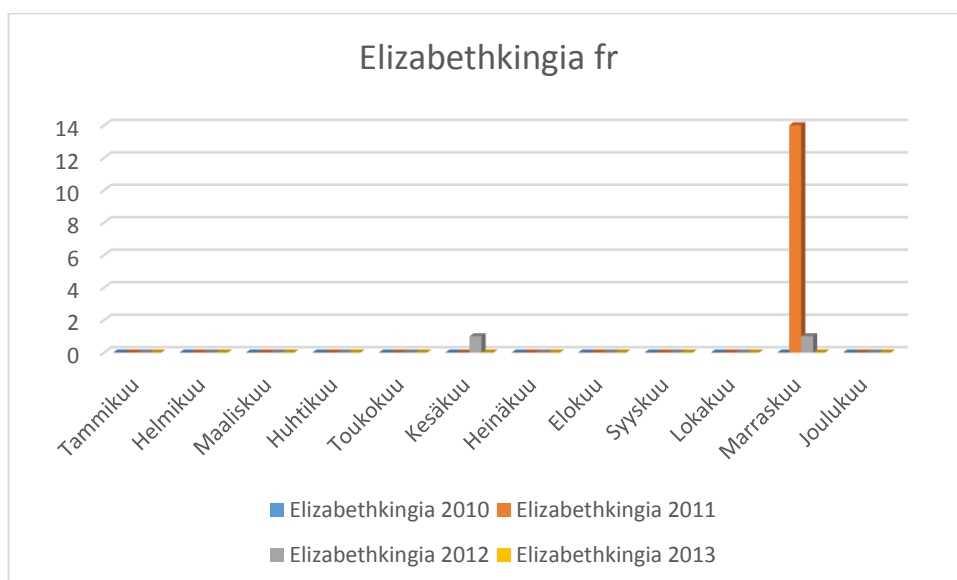
Suurimmat prosentuaaliset osuudet Chryseobacterium-lajia löytyivät vuoden 2011 marraskuussa (7,9 %) ja vuoden 2011 helmikuussa (5,9 %). Muina löydöskuukausina prosentuaaliset osuudet jäivät alle 2,5 % (Kuvio 14).



Kuvio 14. Chryseobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäyttemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

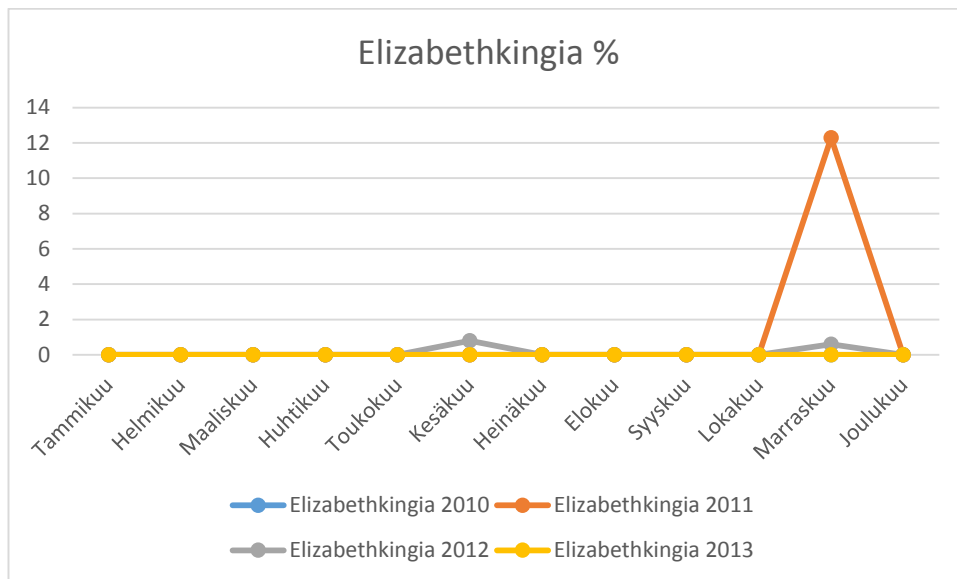
6. Elizabethkingia sp.

Elizabethkingia-lajia löytyi eniten vuoden 2011 marraskuussa, jolloin löydösmäärä oli 14 kpl. Vähäisiä määriä löytyi myös vuoden 2012 kesäkuussa ja marraskuussa (1 kpl) (Kuvio 15).



Kuvio 15. Elizabethkingia-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

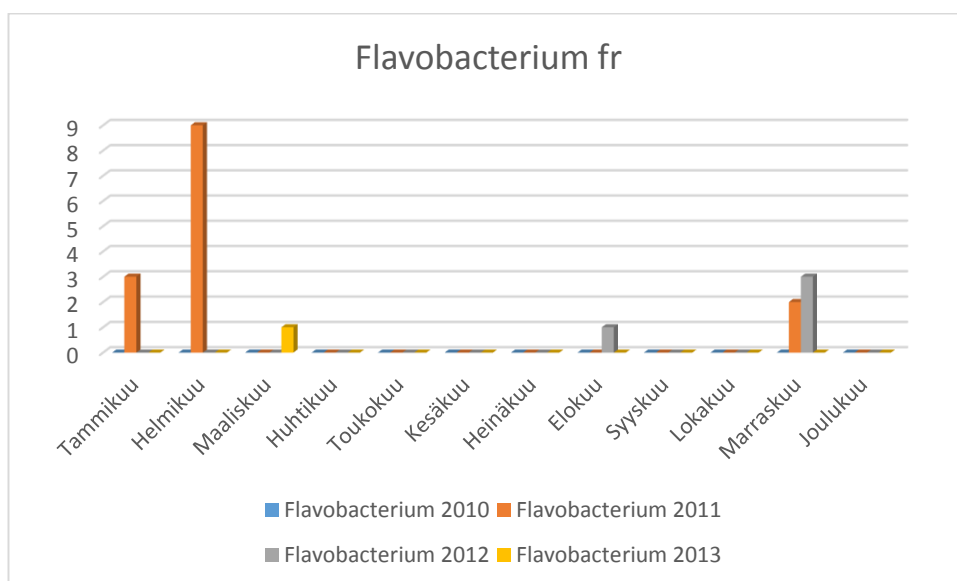
Vuoden 2011 marraskuun löydösmäärän prosentuaalinen osuus oli 12,3 %. Vuoden 2012 kesäkuussa 0,8% ja marraskuussa 0,6 % (Kuvio 16).



Kuvio 16. Elizabethkingia-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

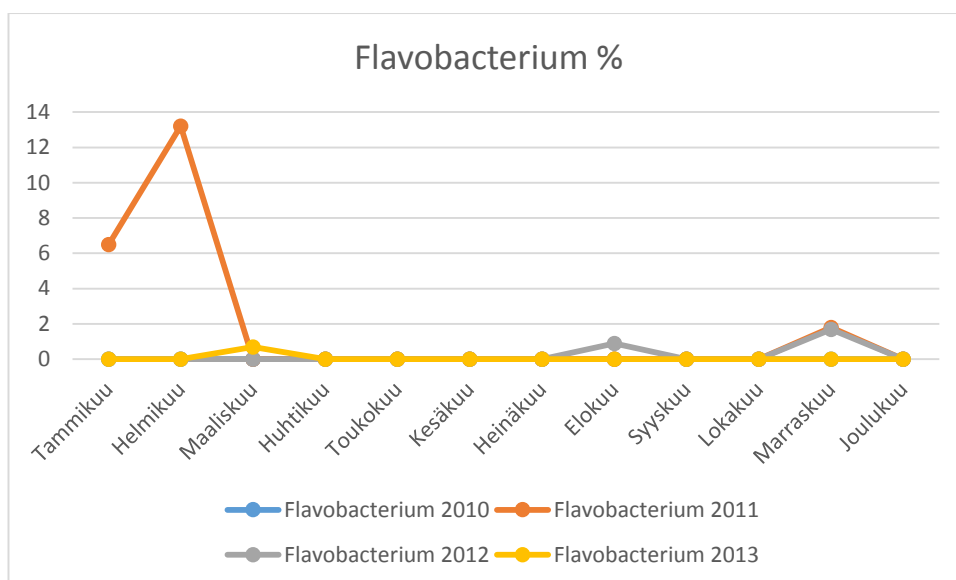
7. Flavobacterium sp.

Flavobacterium-lajia löytyi vuonna 2011 tammikuussa 3kpl, helmikuussa 9 kpl ja marraskuussa 2 kpl. Vuoden 2012 elokuussa löytyi 1 kpl ja marraskuussa 3 kpl. Vuoden 2013 maaliskuussa löytyi 1 kpl (Kuvio 17).



Kuvio 17. Flavobacterium-lajin kontaminaatiolöydöksen frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

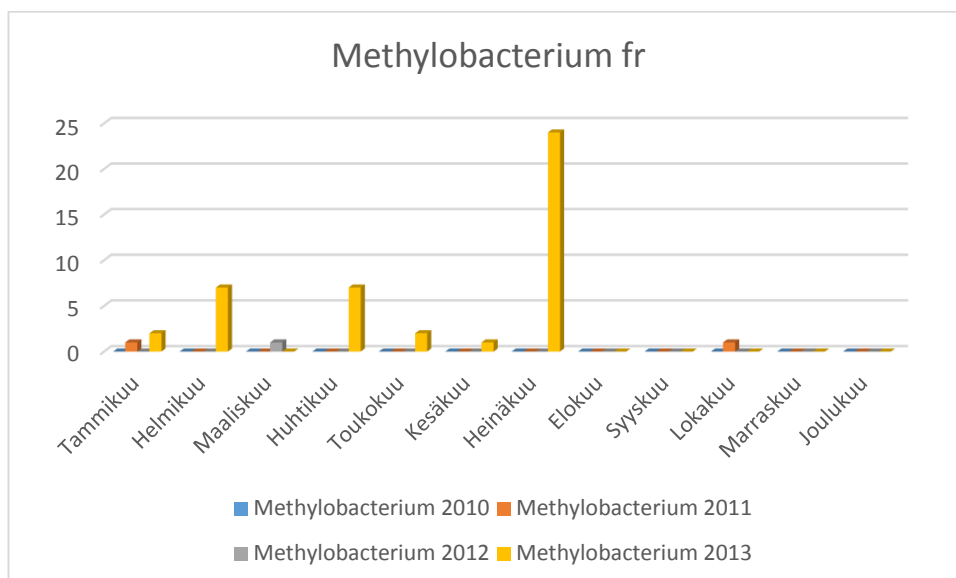
Vuoden 2011 helmikuussa Flavobacterium-lajin prosentuaalinen osuus oli 13,2 %, tammikuussa 6,5 % ja marraskuussa 1,8 %. Vuoden 2012 elokuussa osuus oli 0,9 % ja marraskuussa 1,7 %. Vuoden 2013 Flavobacterium-lajin osuus oli 0,7 % (Kuvio 18).



Kuvio 18. Flavobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytelmästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

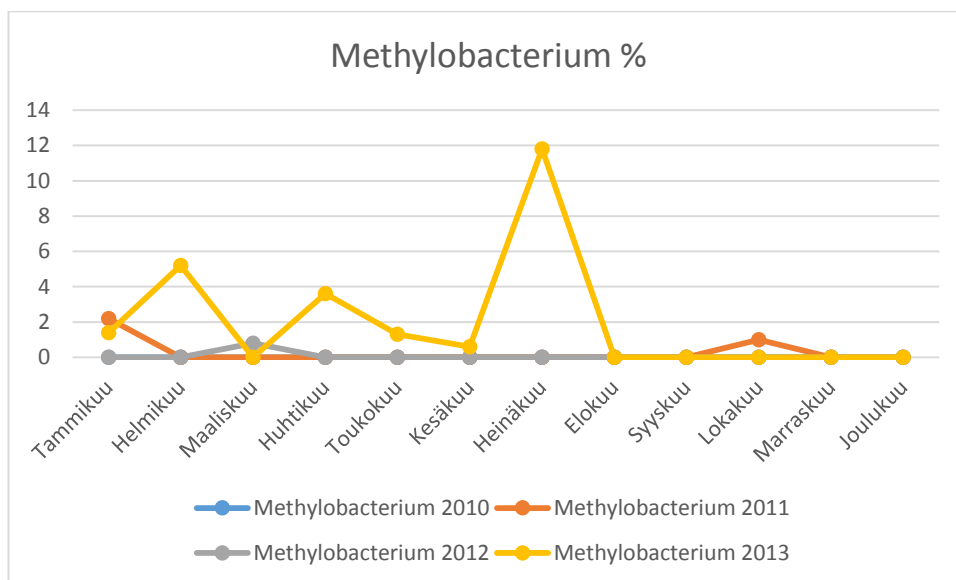
8. Methylobacterium sp.

Eniten Methylobacterium-lajia löytyi vuoden 2013 heinäkuussa, 24 kpl. Saman vuoden helmi- ja huhtikuussa löytyi 7 kpl per kuukausi. Yhdet kappaleet kyseistä lajia löytyi vuoden 2011 tammi- ja lokakuussa, vuoden 2012 maaliskuussa sekä vuoden 2013 kesäkuussa. Vuoden 2013 tammi- ja toukokuussa Methylobacterium-lajia löytyi kahdet kappaleet (Kuvio 19).



Kuvio 19. Methylobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

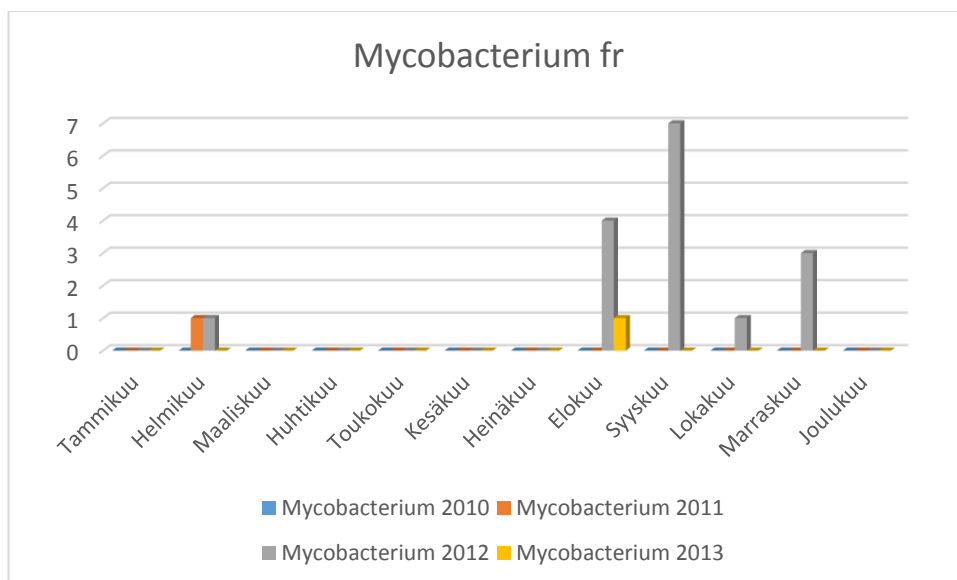
Vuoden 2013 heinäkuussa kontaminaatiolajin prosentuaalinen osuus koko näytemäärästä oli 11,8 %. Saman vuoden helmikuussa prosentuaalinen osuus oli 5,2 % ja huhtikuussa 3,6 %. Muutoin prosentuaaliset osuudet olivat $\leq 2,2$ % (Kuvio 20).



Kuvio 20. Methylobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

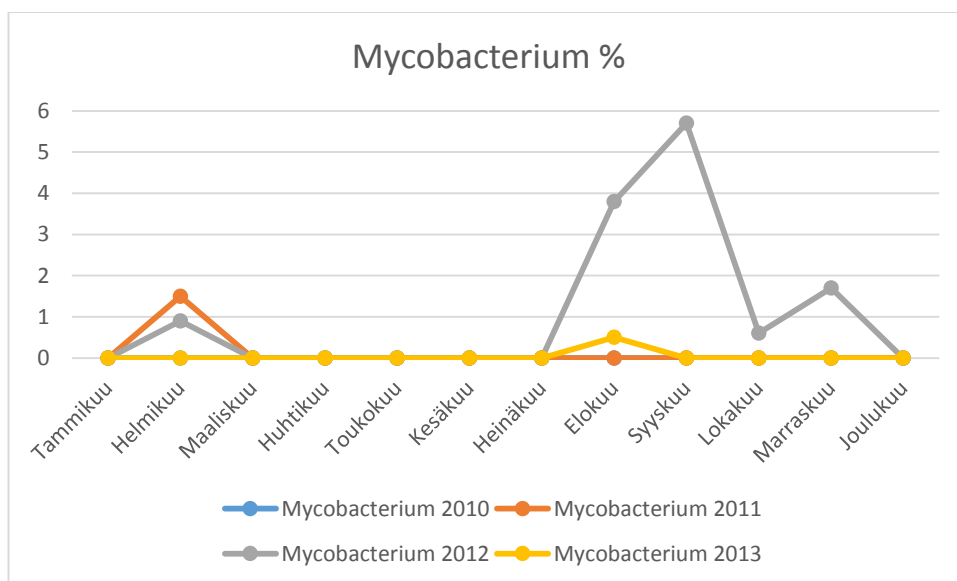
9. Mycobacterium sp.

Mycobacterium-lajia löytyi eniten vuonna 2012; helmi- ja lokakuussa yhdet kappaleet, marraskuussa 3kpl, elokuussa 4 kpl ja syyskuussa 7 kpl. Myös vuoden 2011 helmikuussa ja vuoden 2013 elokuussa Mycobacterium-lajia löytyi yhdet kappaleet (Kuvio 21).



Kuvio 21. Mycobacterium-lajin kontaminaatiolöydöksiä frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

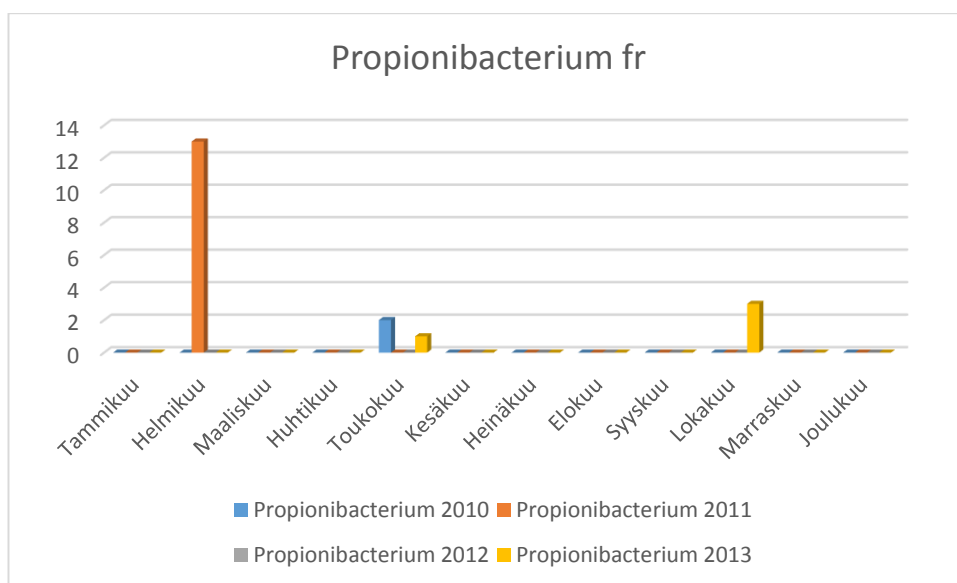
Vuoden 2012 syyskuussa Mycobacterium-lajin prosentuaalinen osuus oli 5,7 % ja elokuussa 3,8 %. Muutoin prosentuaalinen osuus oli $\leq 1,5$ % (Kuvio 22).



Kuvio 22. Mycobacterium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

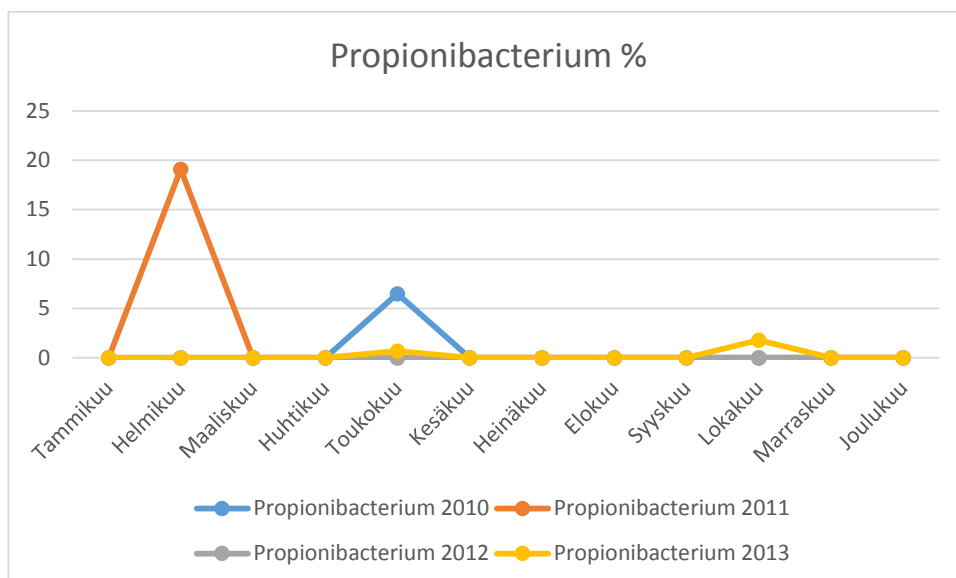
10. Propionibacterium sp.

Eniten Propionibacterium-lajia löytyi vuoden 2011 helmikuussa, 13 kpl. Muutamia kappaleita löytyi myös vuoden 2013 touko- ja lokakuussa, sekä vuoden 2010 toukokuussa (Kuvio 23).



Kuvio 23. Propionibacterium-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

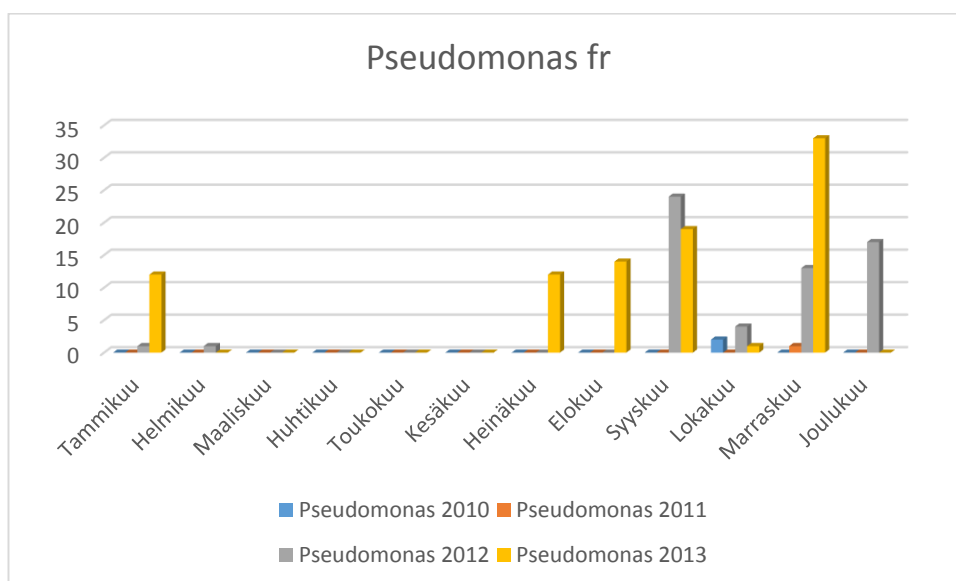
Vuoden 2011 helmikuussa Propionibacterium-lajin prosentuaalinen osuus koko näytemäärästä oli 19,1 %. Vuoden 2010 toukokuussa prosentuaalinen osuus oli 6,5 %, vuoden 2013 toukokuussa 0,7 % ja lokakuussa 1,8 % (Kuvio 24).



Kuvio 24. Propionibacterium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytämäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

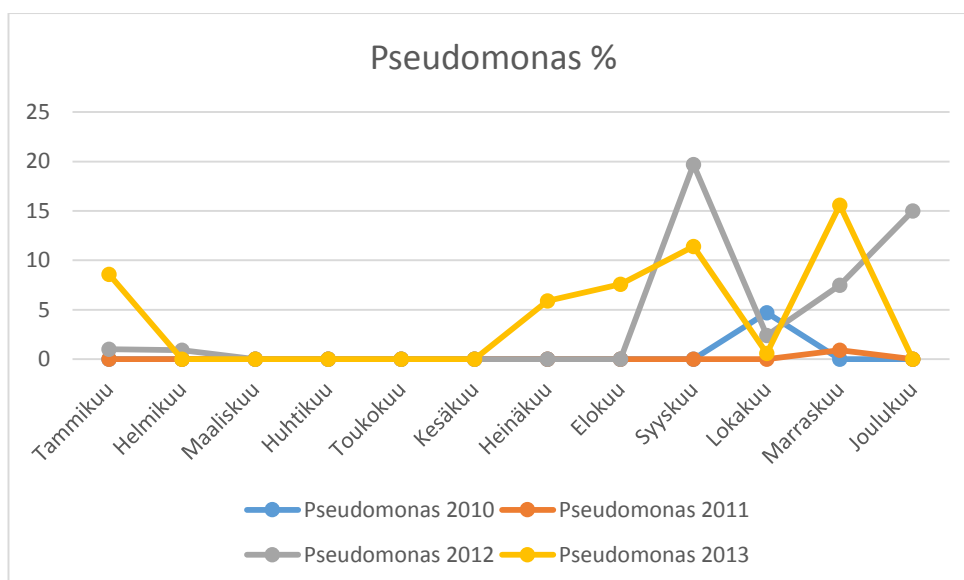
11. Pseudomonas sp.

Pseudomonas-lajia löytyi useana eri kuukautena, eniten vuonna 2013. Vuoden 2013 tammikuussa löytyi 12 kpl, heinäkuussa 12 kpl, elokuussa 14 kpl, syyskuussa 19 kpl, lokakuussa 1 kpl ja marraskuussa 33 kpl. Vuoden 2012 kyseistä lajia löytyi syyskuussa 24 kpl, lokakuussa 4kpl, marraskuussa 13 kpl ja joulukuussa 17 kpl. Vuoden 2010 lokakuussa lajia löytyi 2 kpl ja 2011 marraskuussa 1 kpl (Kuvio 25).



Kuvio 25. Pseudomonas-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

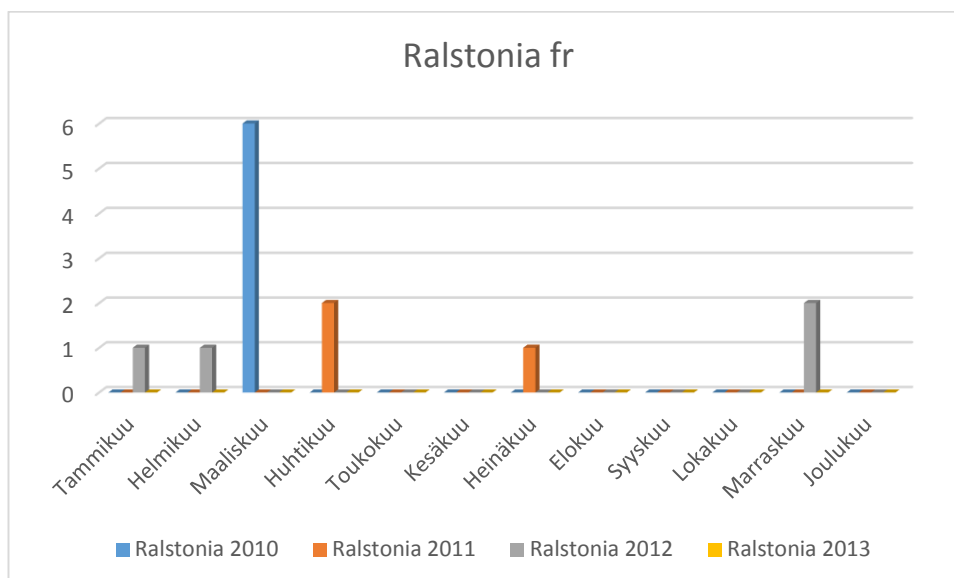
Eniten prosentuaalisesti *Pseudomonas*-lajia löytyi vuoden 2012 syyskuussa, 19,7 % eli lähes viidennes koko näytemäärästä. Saman vuoden marraskuussa osuus oli 7,5 % ja joulukuussa 15 %. Vuoden 2013 tammikuussa osuus oli 8,6 %, heinäkuussa 5,9 %, elokuussa 7,6 %, syyskuussa 11,4 % ja marraskuussa 15,6 %. Vuoden 2010 lokakuussa osuus oli 4,7 %. Muulloin prosentuaalinen osuus oli $\leq 2,4$ % (Kuvio 26).



Kuvio 26. *Pseudomonas*-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

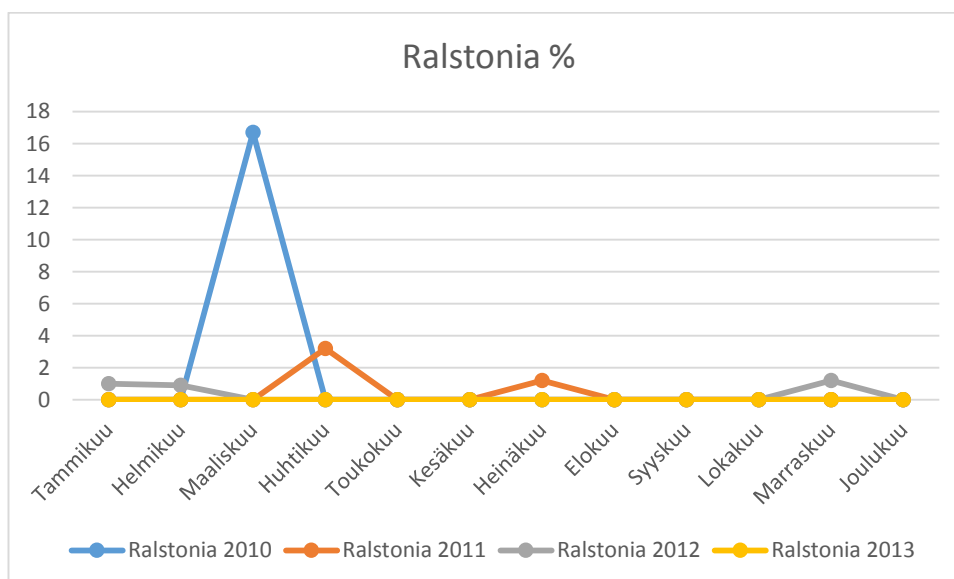
12. *Ralstonia* sp.

Ralstonia-lajia löytyi vuoden 2010 maaliskuussa 6 kpl, vuoden 2011 helmikuussa ja vuoden 2012 marraskuussa kahdet kappaleet. Yksittäisiä kappaleita löytyi vuoden 2012 tammi- ja helmikuussa sekä vuoden 2011 heinäkuussa (Kuvio 27).



Kuvio 27. Ralstonia-lajin kontaminaatiolöydöksiä frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

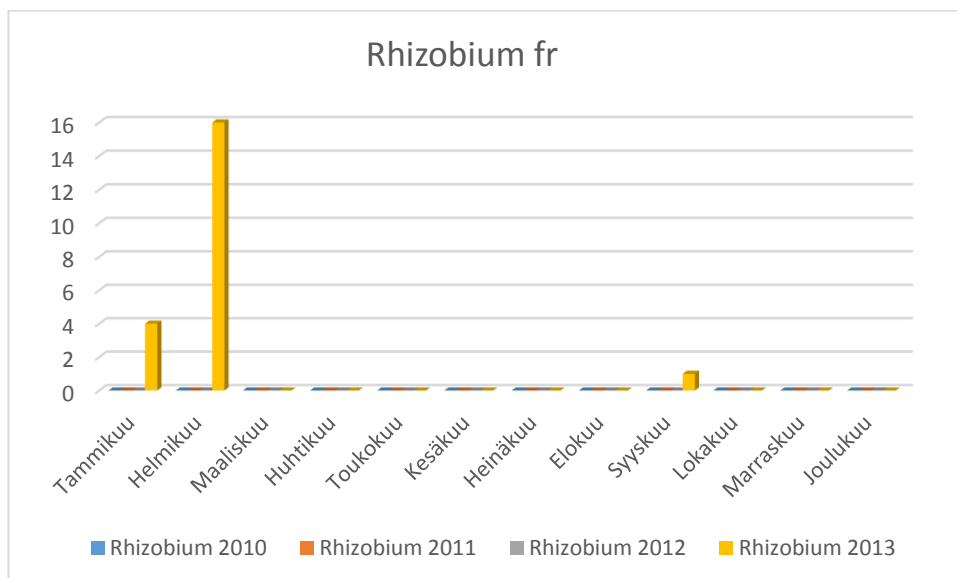
Ralstonia-lajin prosentuaalinen osuus oli suurin vuoden 2010 maaliskuussa, 16,7 %. Muulloin prosentuaalinen osuus oli $\leq 3,2$ % (Kuvio 28).



Kuvio 28. Ralstonia-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

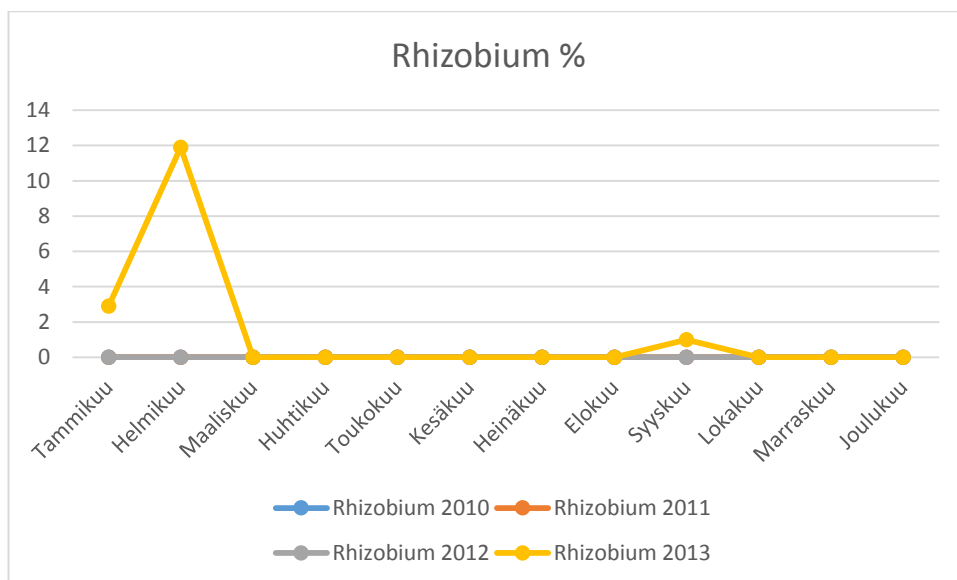
13. Rhizobium sp.

Rhizobium-lajia löytyi ainoastaan vuonna 2013. Tammikuussa löytyi 4 kpl, helmikuussa 16 kpl ja syyskuussa 1 kpl (Kuvio 29).



Kuvio 29. Rhizobium-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

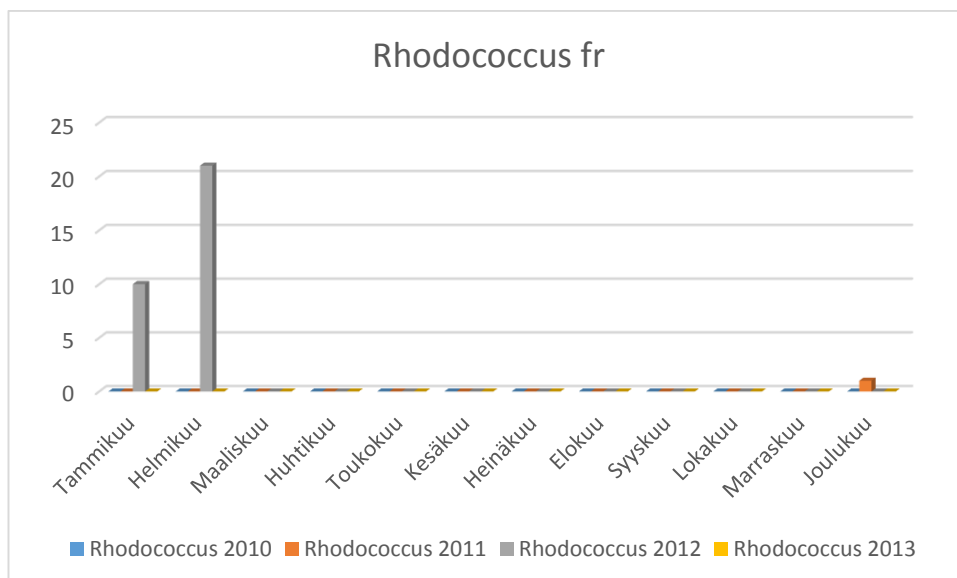
Helmikuussa 2013 Rhizobium-lajin prosentuaalinen osuus koko näytemäärästä oli 11,9 %. Tammikuussa osuus oli 2,9 % ja syyskuussa 1,0 % (Kuvio 30).



Kuvio 30. Rhizobium-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

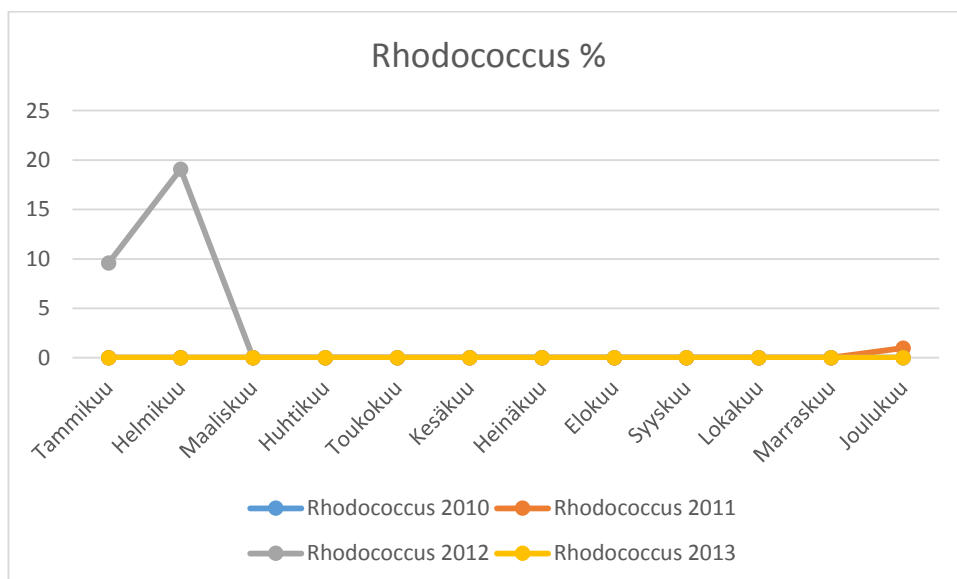
14. Rhodococcus sp.

Rhodococcus-lajia löytyi eniten vuoden 2012 tammikuussa 10 kpl ja helmikuussa 21 kpl. Myös vuoden 2011 joulukuussa lajia löytyi 1 kpl (Kuvio 31).



Kuvio 31. Rhodococcus-lajin kontaminaatiolöydösten frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

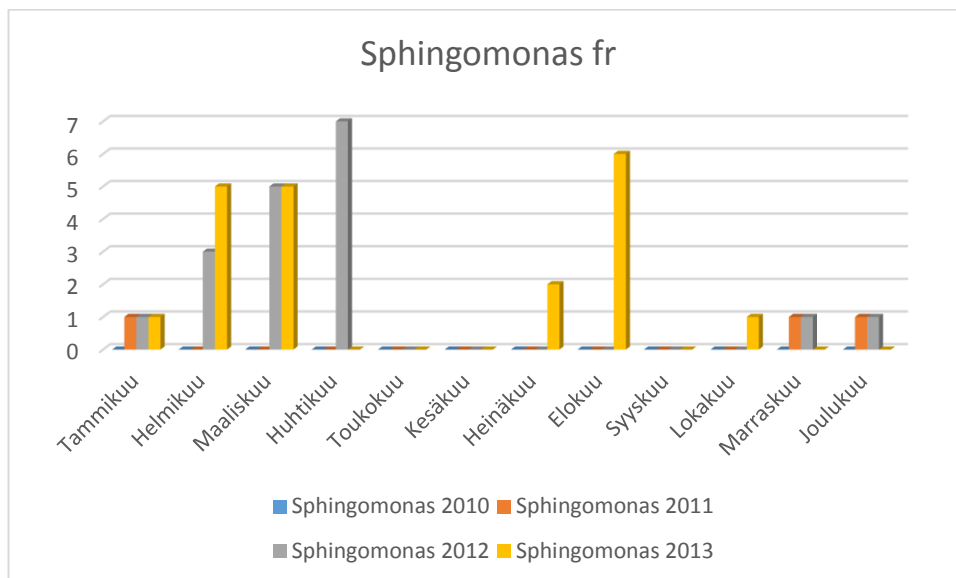
Vuoden 2012 tammikuussa Rhodococcus-lajin prosentuaalinen osuus oli 9,6 %, helmikuussa 19,1 % ja vuoden 2011 joulukuussa 1,0 % (Kuvio 32).



Kuvio 32. Rhodococcus-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäyttemäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

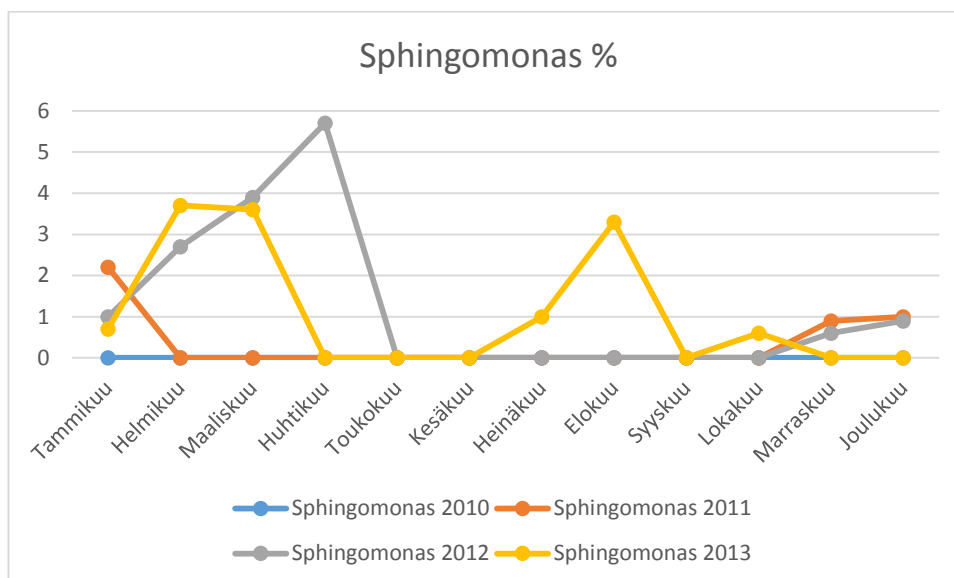
15. Sphingomonas sp.

Sphingomonas-lajia on löytynyt useana kuukautena eri vuosina. Vuoden 2011 tammi-, marras- ja joulukuussa löytyi yhdet kappaleet. Samoin yhdet kappaleet löytyi vuoden 2012 tammi-, marras- ja joulukuussa sekä vuoden 2013 tammi- ja lokakuussa. Vuoden 2012 helmikuussa löytyi 3kpl, maaliskuussa 5 kpl ja huhtikuussa 7 kpl. Vuoden 2013 helmi- ja maaliskuussa löytyi 5 kpl, heinäkuussa 2 kpl sekä elokuussa 6 kpl (Kuvio 33).



Kuvio 33. Sphingomonas-lajin kontaminaatiolöydöksiä frekvenssien muutokset vuosina 2010-2013.

Vuoden 2012 huhtikuussa Sphingomonas-lajin prosentuaalinen osuus oli 5,7 %, maaliskuussa 3,9 %. Vuoden 2013 helmikuussa osuus oli 3,7% ja maaliskuussa 3,6 %. Muulloin osuus oli $\leq 3,3$ % (Kuvio 34).



Kuvio 34. Sphingomonas-lajin kontaminaatiolöydösten prosentuaaliset osuudet kokonaisnäytämäärästä kuukausittain vuosina 2010-2013.

7.3 Toiminnan muutokset PCR-laboratoriossa vuosina 2010-2013

Erilaisia toiminnan muutoksia sähköposteista, kokousmuistiomerkinnoistä, päiväkirjoista ja potilastietojärjestelmästä kerättiin yhteensä 42 kpl. Vuonna 2010 toiminnan muutoksia tehtiin 7 kpl, vuonna 2011 10 kpl, vuonna 2012 15 kpl ja vuonna 2013 10 kpl. Toiminnan muutokset luokiteltiin aiemmin mainittuihin neljään eri kategoriaan (ks. sivu 6): ympäristöön, henkilökuntaan, käyttötavaroihin sekä reagensseihin ja laitteisiin. Muutokset koodattiin Y=ympäristö, H=henkilökunta, K=käyttötavarat, RL=reagenssit ja laitteet sekä juoksevilla numerolla.

7.3.1 Ympäristö

Ympäristön toiminnan muutoksiin sisältyvät muutokset huoneiden siivouskäytännöissä ja tilamuutokset. Ympäristöön liittyviä toiminnan muutoksia tehtiin yhteensä 13 kpl; vuonna 2011 3 kpl, vuonna 2012 7 kpl ja vuonna 2013 3 kpl. Vuonna 2010 ei ole kirjattu yhtään toiminnan muutosta ympäristöön liittyen. Muutokset ovat koodattu taulukkoon Y1-Y13 (Taulukko 4.). Tehdyt muutokset on kirjoitettu jäljempänä auki.

Taulukko 4. Ympäristöön liittyvät toiminnanmuutokset PCR-laboratoriossa vuosina 2010-2013.

| YMPÄRISTÖ | | |
|-----------|-------|---|
| Pvm | Koodi | Toiminnan muutos |
| 2011 | | |
| 28.11. | Y1 | Väliaikainen puhtaan huoneen toiminnan siirto E131. |
| 1.12. | Y2 | Uudella DNA-eristyslaitteella uudet reagenssikasetit käyttöön |
| 2.12. | Y3 | YB-PCR:n puhdas huone toiminta siirtyy väistötilaan |
| 2012 | | |
| 29.2. | Y4 | Puhtaassa huoneessa siirrytään käyttämään UV-valoa |
| 29.2. | Y5 | Puhtaan huoneen väistö päättyy |
| 1.6. | Y6 | Puhdas huoneen lämpötilaa laskettu |
| 26.6. | Y7 | Puhtaan huoneen uusi siivousohje |
| 18.11. | Y8 | PCR-tilojen uusi siivousohje |
| 21.11. | Y9 | UV-valotus reagenssikaseteille |
| 7.12. | Y10 | DNA-vapaat PCR-reagenssit säilytetään isossa pakastimessa |
| 2013 | | |
| 11.1. | Y11 | Siivoukseen käytettävä vesi vaihtuu |
| 2.5. | Y12 | DNA-vapaa H ₂ O jaetaan toisissa tiloissa |
| 4.-7.6. | Y13 | Templaattihuoneen evakko |

Y1=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan puhtaan huoneen toiminta siirrettiin väliaikaisesti toiseen työtilaan. Epäiltiin, että puhtaan huoneen ympäristössä, esimerkiksi ilmassa voisi olla bakteerin DNA-jäämiä, jotka aiheuttivat kontaminaatioita.

Y2=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan uudemmallalla DNA-eristysautomaatilla otettiin käyttöön uudet reagenssikasetit, joiden reagenssien päällä oleva foliosuoja lävistetään työkalulla, eikä revitä irti kuten aiemmin.

Y3=Kokousmuistiomerkinäissä luki, että YB-PCR:n puhtaan huoneen toiminta siirtyi väistötilaan oikean puhtaan huoneen remontin ajaksi. Tämä liittyy toiminnan muutokseen Y1. Puhtaassa huoneessa havaittiin muutama rakenteellinen vika, jotka remontissa korjattiin.

Y4=Sähköpostin mukaan puhtaassa huoneessa siirryttiin käyttämään UV-valoa laboratoriotilassa sekä laminaarikaapissa. Aiemmin UV-valoa ei käytetty rutiininomaisesti, vain kontaminaatiotilanteissa. UV-valo tuhoaa tutkitusti DNA-jäämiä ympäristöstä.

Y5=Sähköpostin mukaan puhtaan huoneen toiminta muutti takaisin oikeaan puhdas huone-tilaan. Remontin yhteydessä puhdas huone muutettiin ylipaineistetuksi ja käyttöön otettiin myös uudet pakastimet, joissa PCR-reagensseja säilytetään. Uudet pakastimet soveltuivat paremmin laboratoriotyöskentelyyn.

Y6=Kokousmuistiomerkinän mukaan puhtaan huoneen lämpötilaa laskettiin 1°C verran. Huoneessa oli liian lämmin työskennellä, ja pinnat sekä tavarat saattoivat olla kosteita aiheuttaen näin mahdollisesti vajavuuksia ympäristön puhtauteen.

Y7=Sähköpostin perusteella puhtaassa huoneessa otettiin käyttöön uudet siivousohjeet; jatkossa pinnat puhdistetaan ensin 2%:lla Decon-liuoksella sekä pyyhitään steriilillä vedellä ja 70 % etanolilla. Kaikki roskat viedään pois päivittäin ja UV-valo laitetaan huoneeseen työn loputtua 60 minuutiksi. Ajatuksena oli, että tilojen desinfiointi on voinut olla puutteellista, jolloin ympäristöön on voinut jäädä DNA-jäämiä edellisen työskentelyn päätyttyä.

Y8=Kokousmuistiomerkinän mukaan PCR-tilojen puhdistamiseen alettiin käyttämään vastedes vain DNA OFF-liuosta ja autoklavoitua vettä, 70 % etanolia käytetään jatkossa vain kontaminaatiotilanteissa. Aiemmin käytettiin saippuapohjaista puhdistusainetta, nyt käyttöön otettiin klooripohjainen puhdistusaine, jonka tulisi puhdistaa pinnat tehokkaammin.

Y9=Potilastietojärjestelmän muistilappumerkinän mukaan uudemmassa DNA-eristysautomaatissa käytettyjen reagenssikasettien foliopinnat UV-valotetaan yhden tunnin ajan ennen käyttöä.

Y10=Sähköpostin mukaan YB-PCR:ssä käytetyt PCR-reagenssit alettiin säilyttämään toistaiseksi toisessa pakastimessa. Epäiltiin, että käytössä olleen pakastimen tiivisteistä tai jostain muualta pakastimesta voi tulla kontaminaatioita reagensseihin.

Y11= Kokousmuistiomerkinän mukaan puhtaassa huoneessa alettiin käyttämään putsaamisessa jatkossa autoklavoidun veden sijaan kaupallista, DNA-vapaaksi todettua vettä. PCR:ssä käytetty vesi voi olla yksi potentiaalinen kontaminaatiolähde, jonka vuoksi käyttöön haluttiin todistetusti DNA-vapaa vesi.

Y12=Kokousmuistiomerkinän mukaan PCR-töissä käytetty DNA-vapaaksi todettu vesi jaetaan jatkossa eri tiloissa kuin ennen. Veden jakaa toisen yksikön henkilökunta, ja muutoksella haluttiin helpottaa työskentelyä siirtämällä jakaminen heitä lähemmäksi. Tässä tapauksessa ympäristö siis muuttui toiseksi.

Y13=Sähköpostin mukaan templaattihuoneen toiminta oli evakossa 4.-7.6.2013, jolloin työskentely-ympäristö oli eri kuin normaalisti.

7.3.2 Henkilökunta

Henkilökunnan toiminnan muutoksiin sisältyvät henkilökunnan pukeutumismuutokset sekä henkilökuntavaihdokset. Henkilökuntaan liittyviä toiminnan muutoksia tehtiin yhteensä 19 kpl; vuonna 2010 2 kpl, vuonna 2011 1 kpl, vuonna 2012 4 kpl ja vuonna 2013 2 kpl. Muutokset ovat koodattu taulukkoon H1-H9 (Taulukko 5.). Tehdyt muutokset on kirjoitettu jäljempänä auki.

Taulukko 5. Henkilöstöön liittyvät toiminnanmuutokset PCR-laboratoriossa vuosina 2010-2013.

| HENKILÖKUNTA | | |
|---------------|-----------|---|
| Pvm | Koodi | Toiminnan muutos |
| 2010 | | |
| 26.8. | H1 | Ulkopuolisten siivoajien uusi huonejärjestys siivoamisessa |
| 10.12. | H2 | Näytekasittelyhuone muuttuu puhtausasteeltaan |
| 2011 | | |
| 21.11. | H3 | PCR-työntekijät siivoavat PCR-huoneet |
| 2012 | | |
| 14.5. | H4 | Puhdas huoneen ovi lukossa |
| 1.6. | H5 | Templaattihuone muuttuu puhtausasteeltaan |
| 23.10. | H6 | Elatusaineille ohje puhtaan huoneen toimintaan |
| 7.12. | H7 | Kahdet käsiaineet käyttöön näytekasittely- ja templaattihuoneissa |
| 2013 | | |
| 11.1. | H8 | Vanhemman DNA-eristysautomaatin lyysispuskureiden jako siirtyy muille |
| 15.2. | H9 | Kahdet steriilit käsiaineet YB-PCR:ssä tehtäessä |

H1=Sähköpostin mukaan ulkopuoliset siivoajat siivoavat vastaisuudessa PCR-laboratoriotilat ennaltaan sovitussa järjestyksessä: ensimmäisenä puhdas huone, toisena templaattihuone ja viimeiseksi näytekasittelyhuone. Ajatuksena taustalla on, että huoneet siivotaan niiden puhtausasteluokittelun mukaan, jotta siivoajat eivät vie likaisemmasta huoneesta puhtaaseen huoneeseen mahdollisia DNA-jäämiä.

H2=Sähköpostin mukaan näytekäsittelyhuoneessa henkilökunta alkoi käyttämään työvaatteidensa päällä lisäksi mikrosuojatakia ja käsissä hansikkaita koko huoneessa oloajan.

H3=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan PCR-henkilökunta siivoaa jatkossa kaikki PCR-tilat. Ajatuksena oli, että muut kuin PCR-laboratorion työntekijät eivät välttämättä osaa ottaa huomioon PCR:n kontaminaatioherkkyyttä puhdistamisen yhteydessä.

H4=Sähköpostin mukaan puhtaan huoneen ovi aletaan laittamaan lukkoon, jolloin laboratoriotilaan ei pääse kukaan henkilökuntaan kuulumaton ilman avainta. Näin tilassa ei pääse kulkemaan kukaan ilman asianmukaista pukeutumista.

H5=Kokousmuistiomerkin mukaan templaattihuone luokitellaan vastedes puhtausasteeltaan näytekäsittelyhuoneen kaltaiseksi, joka tarkoittaa käytännössä sitä, että myös templaattihuoneesta voi palata takaisin puhtaaseen huoneeseen saman päivän aikana.

H6=Sähköpostin mukaan toinen yksikkö alkaa käyttämään puhdas huonetta jakaakseen PCR-vettä PCR-laboratoriolle. Osaston henkilökunta ohjeistetaan toimimaan ja pukeutumaan tilassa samoin kuten PCR-henkilökunta.

H7=Sähköpostin mukaan sekä näytekäsittely- että templaattihuoneessa aletaan käyttämään yksien käsineiden sijaan kaksia käsineitä, joista päällimmäiset vaihdetaan aina, jos niille roiskuu jotain tai siivouksen jälkeen. Näin estetään mahdollisten kontaminaatioiden siirtyminen henkilökunnan välityksellä esimerkiksi puhtaisiin reagenssiputkiin.

H8=Kokousmuistiomerkin mukaan vanhemman DNA-eristysautomaatin lyysispuskureiden (joita käytetään DNA-eristyksessä) jakaminen siirtyy toiselta yksiköltä toisen yksikön hoidettavaksi.

H9=Kokousmuistiomerkin mukaan yleis-bakteeri-PCR:ä tehtäessä aletaan käyttämään kaikissa työvaiheissa kaksia steriilejä käsineitä, joista päällimmäisiä vaihdetaan tarvittaessa. Aiemmin on käytetty tavallisia ei-steriilejä tuplakäsineitä. Epäiltiin, tavalliset tehdaspuhtaat käsineet voisivat sisältää pieniä määriä DNA-jäämiä.

7.3.3 Käyttötavarat

Käyttötavaroiden toiminnan muutoksiin sisältyvät uudet tavarat PCR-työskentelyssä sekä tavaroiden puhdistamismuutokset. Käyttötavaroihin liittyviä toiminnan muutoksia tehtiin yhteensä 4 kpl; vuonna 2011 1 kpl ja vuonna 2012 3 kpl. Vuosina 2010 ja 2013 ei ole kirjattu yhtään toiminnan muutosta käyttötavaroihin liittyen. Muutokset ovat koodattu taulukkoon K1-K4 (Taulukko 6.). Tehdyt muutokset on kirjoitettu jäljempänä auki.

Taulukko 6. Käyttötavaroihin liittyvät toiminnanmuutokset PCR-laboratoriossa vuosina 2010-2013.

| KÄYTTÖTAVARAT | | |
|---------------|-------|--|
| Pvm | Koodi | Toiminnan muutos |
| 2011 | | Puhtaan huoneen uudet ohjeistukset |
| 21.11. | K1 | |
| | | |
| 2012 | | Näyttekäsittelyhuoneessa uusi siivousohje käyttötavaroille |
| 18.5. | K2 | |
| 3.9. | K3 | |
| 7.12. | K4 | |

K1=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan puhtaassa huoneessa otettiin käyttöön nokkapullot suihkepullojen sijaan. Pullot sisältävät puhdistusaineita. Epäiltiin, että suihkepullot voivat levittää suihkuttaessa mahdollisia kontaminaatioita aerosolina.

K2=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan näyttekäsittelyhuoneen käyttötavarat (telineet yms.) aletaan puhdistamaan jatkossa ensin 2,2 % Decon-liuoksella, jonka jälkeen käyttötavarat huuhdellaan kraanavedellä ja pyyhitään 70 % etanolilla. Epäiltiin, ettei käyttötavaroita desinfioida tarpeeksi hyvin ja niihin on voinut jäädä DNA-jäämiä aiempien puhdistustoimien seurauksena.

K3=PCR-päiväkirjan mukaan puhtaasta huoneesta poistettiin roska-astioina käytössä olleet muovikanisterit ja tilalle otetaan käyttöön lasiset purkit. Muovikanisterit ovat voineet olleet potentiaalinen kontaminaatiolähde, sillä niitä ei ole säilytetty ennen käyttöön ottoa tarpeeksi puhtaissa tiloissa PCR-tiloja ajatellen.

K4=Sähköpostin mukaan puhtaassa huoneessa alettiin pitämään yleis-bakteeri-PCR:ä varten omat eppendorfputket, joihin PCR-reaktiomixit tehdään.

7.3.4 Reagenssit ja laitteet

Reagenssien ja laitteiden muutoksiin sisältyvät muutokset laitteiden käytössä ja puhdistamisessa sekä reagenssien vaihtumiset tai muut muutokset. Reagensseihin ja laitteisiin liittyviä toiminnan muutoksia tehtiin yhteensä 16 kpl; vuonna 2010 5 kpl, vuonna

2011 5 kpl, vuonna 2012 1 kpl ja vuonna 2013 5 kpl. Muutokset ovat koodattu taulukkoon RL1-RL16 (Taulukko 7.). Tehdyt muutokset on kirjoitettu jäljempänä auki.

Taulukko 7. Reagensseihin ja laitteisiin liittyvät toiminnanmuutokset PCR-laboratoriossa vuosina 2010-2013.

| REAGENSsit JA LAITTEET | | |
|------------------------|-------|--|
| Pvm | Koodi | Toiminnan muutos |
| 2010 | | |
| 19.3. | RL1 | YB-PCR:än vain DNA-vapaa H ₂ O |
| 26.3. | RL2 | Vanhemman DNA-eristyslaitteen uusi puhdistustapa |
| 26.3. | RL3 | kolumnieristys käyttöön |
| 21.5. | RL4 | kolumnieristys käyttöön |
| 8.12. | RL5 | Uusi DNA-eristyslaite käyttöön |
| 2011 | | |
| 21.1. | RL6 | Uusi DNA-eristysohje kudoshomogenisaattorille |
| 21.1. | RL7 | Uudet alukkeet käyttöön |
| 7.10. | RL8 | DNA-vapaat reagenssit käyttöön verinäytteille |
| 14.10. | RL9 | Vanhemman DNA-eristyslaitteen uusi puhdistusohje |
| 9.11. | RL10 | YB-PCR uudet DNA-vapaat reagenssit |
| 2012 | | |
| 22.11. | RL11 | Uudella DNA-eristysautomaatilla uusi protocola |
| 2013 | | |
| 2.1. | RL12 | YB-näytteiden eristyksessä aina TE-puskuri |
| 9.1. | RL13 | Muutos vanhemman DNA-eristyslaitteen puhdistuksessa |
| 2.5. | RL14 | TE-puskuri liuotetaan DNA-vapaaseen H ₂ O |
| 18.10. | RL15 | DNA-vapaata polymeraasia ei jaeta enää eriin |
| 20.11. | RL16 | YB-näytteet eristetään vanhemmalla DNA-eristyslaitteella |

RL1=Kokousmuistiomerkinän mukaan YB-PCR:än alettiin käyttämään vain kaupallista, DNA-vapaaksi todettua vettä. Aiemmin on käytetty autoklavoitua vettä. Epäiltiin, että autoklavoitu vesi on voinut toimia kontaminaatiolähteenä.

RL2=Kokousmuistiomerkinän mukaan vanhemman DNA-eristyslaitteen rutiinipuhdistuksessa alettiin käyttämään joka kerta 0,1 % hypokloriittia. Hypokloriitti voi ehkäistä paremmin kontaminaation ja biofilmiä syntymistä laitteen letkustoihin, joista kontaminaatiot voivat siirtyä näytteisiin.

RL3=Potilastietojärjestelmän muistilappumerkinnän mukaan DNA-eristyksessä otettiin käyttöön varamenetelmänä toimiva kolumnieristys. Vanhassa DNA-eristysautomaatissa epäiltiin olevan kontaminaatio.

RL4=Kokousmuistiomerkinä mukaan DNA-eristyksessä otettiin jälleen käyttöön varamenetelmänä toimiva kolumnieristys. Vanhassa DNA-eristysautomaatissa epäiltiin olevan kontaminaatio.

RL5=Potilastietojärjestelmän muistilappumerkinnän mukaan uusi DNA-eristysautomaatti otettiin käyttöön.

RL6=Kokousmuistiomerkinä mukaan otettiin käyttöön uusi DNA-eristysohje, jossa ohjeistetaan kudoshomogenisaattorin käytöstä. Kudoshomogenisaattoria käytetään näytekäsittelyssä, jolla parannetaan mahdollista bakteeri-DNA-saantia näytteistä

RL7=Potilastietojärjestelmän muistilappumerkinnän mukaan YB-PCR:ssä otettiin käyttöön uudet alukkeet reaktiomixissä.

RL8=Potilastietojärjestelmän muistilappumerkinnän mukaan YB-PCR:än tulleille kokoverinäytteille otettiin käyttöön uudet DNA-vapaaksi todetut eristysreagenssit.

RL9=Kokousmuistiomerkinä mukaan vanhempi DNA-eristyslaite puhdistetaan jatkossa kerran kuukaudessa, entisen 2x/kk sijaan. Vanhaa DNA-eristyslaitetta ei käytetä enää YB-näytteiden käsittelyyn, joten laite ei tarvitse entisen kaltaisia puhdistustoimenpiteitä kontaminaatioita ajatellen.

RL10=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan YB-PCR:ssä alettiin käyttämään DNA-vapaiksi todettuja PCR-reagensseja. Aiempia käytössä olleita PCR-reagensseja ei ole luvattu täysin DNA-vapaiksi valmistajan puolelta.

RL11=Potilastietojärjestelmän muistilappumerkinnän mukaan uudemmalle DNA-eristysautomaatille on asennettu uusi ohjelmaprotocola.

RL12=Sähköpostin mukaan YB-PCR:n näytteiden käsittelyssä alettiin käyttämään aina TE-puskuria.

RL13=Toiminnan muutos-päiväkirjan mukaan vanhemmassa DNA-eristyslaitteessa alettiin käyttämään toista puhdistusainetta rutiinipesussa. Uuden puhdistusaineen uskotaan puhdistavan laitteen paremmin ja ehkäisemään paremmin kontaminaatioiden syntymistä.

RL14=Kokousmuistiomerkinä mukaan TE-puskuri liuotetaan jatkossa kaupalliseen DNA-vapaaksi todettuun veteen. Aiemmin TE-puskuri on liuotettu autoklavoituun veteen ja epäiltiin, ettei autoklavoitu vesi ole tarpeeksi puhdasta PCR-työskentelyä varten.

RL15=Kokousmuistiomerkinä mukaan YB-PCR:ssä käytettyä polymeraasia ei jaeta jatkossa enää käyttöeriin, vaan pidetään koko määrä yhdessä alkuperäisessä putkessa. Epäiltiin, että polymeraasin jakamisessa on kontaminaatoriski.

RL16=Sähköpostin mukaan YB-PCR-näytteet alettiin eristämään vanhemmalla DNA-eristysautomaatilla. Uudemman Dna-eristysautomaatin reagenssien epäiltiin olevan kontaminoituneet.

7.4 Toiminnan muutosten ja kontaminaatiolajien määrien muutoksien välinen yhteys

Kontaminaatiolöydöslajeista tarkemman tutkinnan alle (etsitään toiminnan muutosten ja kontaminaatiolöydösten määrien muuttumisen välisiä yhteyksiä) valittiin 11 kontaminaatiolöydöslajia, joiden määrä kokonaisnäytemäärästä oli ≥ 10 % jonkin kuukauden aikana. Nämä kontaminaatiolöydöslajit olivat *Acidovorax* sp., *Acinetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Elizabethkingia* sp., *Flavobacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Rhizobium* sp. ja *Rhodococcus* sp. (Taulukko 8). Toiminnan muutokset, joiden mahdollista merkitystä kontaminaatiolöydöslajien määrän muuttumiseen haluttiin tarkastella paremmin, valittiin siltä kuukaudesta (joissakin tapauksissa myös useammalta peräkkäiseltä kuukaudesta), jolloin kontaminaatiolöydöslajin määrä oli ≥ 10 % kokonaisnäytemäärästä sekä muutosta edeltävä ja jälkeinen kuukausi.

Taulukko 8. Kontaminaatiolöydöslajit, joiden prosentuaalinen määrä on ollut ≥ 10 % kokonais YB-PCR-näytemäärästä jonkin kuukauden aikana.

| | Kontaminaatiolöydös | Vuosi | Kuukausi | % määrä |
|-----|------------------------------|-------|-----------|---------|
| 1. | <i>Acidovorax</i> sp. | 2013 | joulukuu | 11,9 |
| 2. | <i>Acinetobacter</i> sp. | 2012 | elokuu | 11,3 |
| 3. | <i>Agrobacterium</i> sp. | 2013 | tammikuu | 22,9 |
| | | 2013 | helmikuu | 22,2 |
| 4. | <i>Elizabethkingia</i> sp. | 2011 | marraskuu | 12,3 |
| 5. | <i>Flavobacterium</i> sp. | 2011 | helmikuu | 13,2 |
| 6. | <i>Methylobacterium</i> sp. | 2013 | heinäkuu | 13,2 |
| 7. | <i>Propionibacterium</i> sp. | 2011 | helmikuu | 19,1 |
| 8. | <i>Pseudomonas</i> sp. | 2012 | syyskuu | 19,7 |
| | | 2012 | joulukuu | 15 |
| | | 2013 | syyskuu | 11,4 |
| | | 2013 | marraskuu | 15,6 |
| 9. | <i>Ralstonia</i> sp. | 2010 | maaliskuu | 16,7 |
| 10. | <i>Rhizobium</i> sp. | 2013 | helmikuu | 11,9 |
| 11. | <i>Rhodococcus</i> sp. | 2012 | helmikuu | 19,1 |

Kun tarkempaan selvitykseen valitut toiminnan muutokset oli kerätty, tuli potilastietojärjestelmästä käydä läpi vielä tarkat päivät, jolloin tietty kontaminaatiolaji löytyi ensimmäisen ja viimeisen kerran tarkasteltavan ajanjakson aikana, sillä myös toiminnan muutoksista on tiedossa tarkat päivämäärät. Näin pystyttiin rajaamaan valituista toiminnan muutoksista vielä pois ne toiminnan muutokset pois, jotka eivät vaikuttaneet sopivan yhteen kontaminaatiolöydöslajin määrän muutosten kanssa. Toiminnan muutokset, joiden yhteyttä kontaminaatiolajien määrän muuttumiseen lopulta tarkasteltiin olivat siivoukseen käytettävän veden vaihtaminen (Y11), vanhemman DNA-eristysautomaatin lyysispuskureiden jaon siirtyminen toiselle yksikölle (H8), kaksien steriilien käsineiden käytön aloittaminen YB-PCR:ssä tekemisessä (H9), puhtaan huoneen uusien roska-astoiden käyttöönotto (K3), uuden DNA-eristysohjeen tuleminen kudoshomogenisaattorille (RL6), uusien alukkeiden käyttöönotto (RL7), YB-PCR:n uusien DNA-vapaiden reagenssien käyttöönotto (RL10), DNA-vapaan polymeraasin jakaminen eriin lopettaminen (RL15) ja YB-PCR-näytteiden eristäminen vanhemmalla DNA-eristyslaitteella (RL16).

Kun toiminnan muutos ja kontaminaatiolaji, joiden välistä mahdollista yhteyttä haluttiin selvittää oltiin valittu, laskettiin kuinka monta kappaletta kontaminaatiolajilöydöstä löytyi ennen toiminnan muutospäivää ja sen jälkeen. Aikarajaus, jonka ajalta kontaminaatiolöydöksiä laskettiin, asetettiin aina sen kuukauden alkuun tai loppuun, jolloin kyseisen kontaminaatiolajin löydösmäärä oli 0 kpl.

1. Acidovorax sp.

Acidovorax –lajia oli vuoden 2013 joulukuussa 11,9 % kokonaisnäytemäärästä. Edeltävänä kuukautena marraskuussa Acidovorax-löydöksiä oli 2 %, lokakuussa 0 % (Kuvio 3). Vuoden 2014 tammikuun mahdollista löydösmäärää ei tässä opinnäytetyössä tule esille. Ensimmäinen Acidovorax-laji löytyi 29.11.2013. Toiminnan muutos, jonka yhteyttä Acidovorax-lajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää, oli DNA-eristysautomaatin vaihtaminen vanhaan DNA-eristysautomaattiin = RL16 (Taulukko 7).

Toiminnan muutos RL21 tapahtui 20.11.2013. Ennen toiminnan muutosta Acidovorax-lajia löytyi marraskuussa (1.-19.11.2013) 0 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen marraskuussa (20.11.-31.12.2013) 24 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 119 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 278 kpl (Taulukko 9).

Taulukko 9. Acidovorax-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen RL16.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| Acidovorax-löydös | 0 | 24 | 24 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 119 | 254 | 373 |
| YB-näytteitä yhteensä | 119 | 278 | 397 |

Seuraavaksi laskettiin Acidovorax-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen (Taulukko 10). Odotetut frekvenssit laskettiin aiemman mainitun kaavan mukaan (Kuvio 32).

Taulukko 10. Acidovorax-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| Acidovorax | 7,2 | 16,8 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 111,8 | 261,2 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 11). Khii toiseen –riippumattomuustesti laskettiin aiemmin mainitun kaavan mukaan (Kuvio 33).

H_0 : DNA-eristyslaitteen vaihtamisella toiseen DNA-eristyslaitteeseen (RL16) ei ole yhteyttä Acidovorax-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : DNA-eristyslaitteen vaihtamisella toiseen DNA-eristyslaitteeseen (RL16) on yhteyttä Acidovorax-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 11. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Acidovorax-löydös | 7,193955 | 3,079427 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,462882 | 0,198140 |

Khii toiseen-arvo saatiin laskemalla khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset yhteen (Taulukko 11). Khii toiseen arvoksi saatiin 10,934403. Vapausasteiden määrä oli yksi, kuten aiemmin opinnäytetyössä kohdassa 7.4 selitettiin, jolloin p-arvo on $<0,001$ (Valli 2001: 115). Tulos on siis tilastollisesti erittäin merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva

nollahypoteesi olisi pienempi kuin 0,1 %, joten nollahypoteesi uskalletaan hylätä. DNA-eristyslaitteen vaihtamisella toiseen DNA-eristyslaitteeseen on tilastollisesti merkitsevä yhteys *Acidovorax*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Laskettiin vielä muuttujien välinen kontingenssikerroin aiemmin kuvatun laskukaavan mukaan (Kuvio 32). Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,16, joka on melko lähellä arvoa 0. Muuttujien välillä ei siis esiinny juurikaan minkäänlaista riippuvuutta. DNA-eristyslaitteen vaihtamisella toiseen ei ole kontingenssikertoimen mukaan juurikaan merkitystä *Acidovorax*-kontaminaatiolajin löydösmäärän muuttumiseen.

2. *Acinetobacter* sp.

Acinetobacter-lajia oli vuoden 2012 elokuussa 11,3 % kokonaisnäytemäärästä. Saman vuoden syyskuussa määrä oli 9,0 % ja lokakuussa 0,6 %. Heinäkuussa määrä oli myös 0 % (Kuvio 5). Ensimmäinen *Acinetobacter*-laji löytyi 16.8.2011 ja viimeinen 27.9.2011. Millään toiminnan muutoksella, jotka tulevat tässä opinnäytetyössä esille, ei todennäköisesti ole merkitystä kyseisen kontaminaatiolajin löydösmäärien muuttumiseen.

3. *Agrobacterium* sp.

Agrobacterium-lajia löytyi vuoden 2013 tammikuussa 22,9 % kokonaisnäytemäärästä ja saman vuoden helmikuussa 22,2 %. Maaliskuussa määrä oli 0 % ja vuoden 2012 joulukuussa myös 0 % (Kuvio 7). Ensimmäinen *Agrobacterium*-laji löytyi 16.1.2013 ja viimeinen 22.2.2013. Toiminnan muutos, jonka yhteyttä *Agrobacterium*-lajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää oli kaksien steriilien käsineiden käytön aloittaminen YB-PCR:ä tehtäessä = H9 (Taulukko 5). Toiminnan muutos H10 tapahtui 15.2.2013. Ennen toiminnan muutosta *Agrobacterium*-lajia löytyi tammi-helmikuussa (1.1.-14.2.2013) 52 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen helmikuussa (15.-28.2.2013) 10 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 206 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 62 kpl (Taulukko 12).

Taulukko 12. Agrobacterium-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen H9.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| Agrobacterium-löydös | 52 | 10 | 62 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 154 | 52 | 206 |
| YB-näytteitä yhteensä | 206 | 62 | 268 |

Seuraavaksi laskettiin Agrobacterium-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen (Taulukko 13).

Taulukko 13. Agrobacterium-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| Agrobacterium-löydös | 47,7 | 14,3 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 158,3 | 47,7 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 14).

H_0 : Kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisella (H_9) ei ole yhteyttä Agrobacterium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisella (H_9) on yhteyttä Agrobacterium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 14. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Agrobacterium-löydös | 0,395833 | 1,315188 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,119134 | 0,395833 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 2,225989. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $>0,05$. Tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi suurempi kuin 5 %, joten nollahypoteesia ei hylätä. Kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisella ei ole tilastollisesti merkitsevää yhteyttä Agrobacterium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Laskettiin vielä muuttujien välinen kontingenssikerroin. Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,09. Muuttujien välillä ei siis esiinny riippuvuutta. *Agrobacterium*-lajin löydösmäärän muutos ei ole riippuvainen toiminnan muutoksesta.

4. *Elizabethkingia* sp.

Elizabethkingia-lajia löytyi vuoden 2011 marraskuussa 12,3 %, lokakuussa ja joulukuussa 0 % (Kuvio 13). Ensimmäinen *Elizabethkingia*-laji löytyi 1.11.2011 ja viimeinen 17.11.2011. Toiminnan muutos, jonka yhteyttä *Elizabethkingia*-lajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää oli uusien DNA-vapaiden reagenssien käytön aloittaminen YB-PCR:ä tehtäessä = RL10 (Taulukko 7). Toiminnan muutos RL10 tapahtui 9.11.2011. Ennen toiminnan muutosta *Elizabethkingia*-lajia löytyi marraskuussa (1.-8.11.2011) 2 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen loppumarraskuussa (9.11.-30.11.2011) 12 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 17 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 97 kpl (Taulukko 15).

Taulukko 15. *Elizabethkingia*-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen RL10.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|--------------------------------|-------|---------|----------|
| <i>Elizabethkingia</i> -löydös | 2 | 12 | 14 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 15 | 85 | 100 |
| YB-näytteitä yhteensä | 17 | 97 | 114 |

Seuraavaksi laskettiin *Elizabethkingia*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen. Odotettujen frekvenssien yhdessä solussa arvo oli <5, jolloin tälle solulle tuli tehdä Yatesin korjaus (Taulukko16).

Taulukko 16. *Elizabethkingia*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit Yatesin korjauksella.

| | Ennen | Jälkeen |
|--------------------------------|-------|---------|
| <i>Elizabethkingia</i> -löydös | 2,6 | 11,9 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 14,9 | 85,1 |

Seuraavaksi asetetaan hypoteesit ja tehdään khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 17).

H_0 : Uusilla PCR-reagenssien käyttöönnotolla (RL10) ei ole yhteyttä Elizabethkingia-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Uusilla PCR-reagenssien käyttöönnotolla (RL10) on yhteyttä Elizabethkingia-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 17. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Elizabethkingia-löydös | 0,133482 | 0,000646 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,000516 | 0,000090 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 0,134734. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $>0,05$. Tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi suurempi kuin 5 %, joten nollahypoteesia ei hylätä. Uusilla DNA-vapaiden PCR-reagenssien käyttöönnotolla ei ole merkitystä Elizabethkingia-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,03. Muuttujien välillä ei siis esiinny riippuvuutta. Elizabethkingia-lajin löydösmäärän muuttuminen ei ole riippuvainen toiminnan muutoksesta.

5. Flavobacterium sp.

Flavobacterium-lajia oli vuoden 2011 helmikuussa 13,2 % kokonaisnäytemäärästä. Tammikuussa määrä oli 6,5 % ja vuoden 2010 joulukuussa 0 %. Maaliskuussa 2011 määrä oli myös 0 % (Kuvio 15). Ensimmäinen Flavobacterium-laji löytyi 18.1.2011 ja viimeinen 15.2.2011. Toiminnan muutokset, joiden yhteyttä Flavobacterium-kontaminaatiolajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää olivat uusi DNA-eristysohje kudoshomogenisaattorille = RL6 ja uusien alukkeiden käytön aloittaminen = RL7 (Taulukot 7). Toiminnan muutokset RL6 ja RL7 tapahtuivat molemmat 21.1.2011. Ennen toiminnan muutoksia Flavobacterium-lajia löytyi tammikuussa (1.-20.1.2011) 0 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen tammi-helmikuussa (21.1.-28.2.2011) 12 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 38 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 76 kpl (Taulukko 18).

Taulukko 18. Flavobacterium-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen RL6 ja RL7.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| Flavobacterium-löydös | 0 | 12 | 12 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 38 | 64 | 102 |
| YB-näytteitä yhteensä | 38 | 76 | 114 |

Seuraavaksi laskettiin Flavobacterium-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen. Odotettujen frekvenssien yhdessä solussa arvo oli <5 , jolloin tälle solulle tuli tehdä Yatesin korjaus (Taulukko 19).

Taulukko 19. Flavobacterium-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit Yatesin korjauksella.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| Flavobacterium-löydös | 4,5 | 8,0 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 34,0 | 68,0 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 20).

H_0 : Uudella DNA-eristysohjeella kudoshomogenisaattorille (RL6) tai uusien alukkeiden käyttöönnotolla (RL7) ei ole yhteyttä Flavobacterium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Uudella DNA-eristysohjeella kudoshomogenisaattorille (RL6) tai uusien alukkeiden käyttöönnotolla (RL7) on yhteyttä Flavobacterium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 20. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Flavobacterium-löydös | 4,500000 | 2,000000 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,470588 | 0,235294 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 7,205882. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $<0,01$. Tulos on siis tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi pienempi kuin 1 %, joten nollahypoteesi uskalletaan hylätään. Uusien alukkeiden käyttöönnotolla tai uudella DNA-eristysohjeella kudoshomogenisaattorille on tilastollisesti merkitsevä yhteys Flavobacterium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,24. Muuttujien välillä esiintyy pientä positiivista riippuvuutta kontingenssikertoimen mukaan. *Flavobacterium*-lajin löydösmäärän muuttuminen on hieman riippuvainen uusien alukkeiden käyttöönotosta tai uudesta DNA-eristysohjeesta kudoshomogenisaattorille.

6. *Methylobacterium* sp.

Methylobacterium-lajia löytyi vuoden 2013 heinäkuussa 11,8 %, kesäkuussa 0,6 %. Elokuussa löydösmäärä oli myös 0 % (Kuvio 17). Ensimmäinen *Methylobacterium*-laji löytyi 28.6.2013 ja viimeinen 19.7.2013. Millään toiminnan muutoksella, jotka tulevat tässä opinnäytetyössä esille, ei todennäköisesti ole merkitystä kyseisen kontaminaatiolajin löydösmäärän muuttumiseen.

7. *Propionibacterium* sp.

Propionibacterium-lajia oli vuoden 2011 helmikuussa kokonaisnäytemäärästä 19,1 %. Tammikuussa ja maaliskuussa määrät olivat 0 % (Kuvio 21). Ensimmäinen *Propionibacterium*-laji löytyi 8.2.2011 ja viimeinen 25.2.2011. Millään toiminnan muutoksella, jotka tulevat tässä opinnäytetyössä esille, ei todennäköisesti ole merkitystä kyseisen kontaminaatiolajin löydösmäärän muuttumiseen.

8. *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas-lajia löytyi kahtena eri ajanjaksona selvänä piikkinä (Kuvio 23). Ensimmäinen piikki näkyi vuoden 2012 syksyllä – 2013 alkuvuodesta: 2012 elokuu 0 %, syyskuu 19,7 %, lokakuu 2,4 %, marraskuu 7,5 %, joulukuu 15 %, 2013 tammikuu 8,6 %, helmikuu 0 %. Toinen piikki näkyi vuoden 2013 loppupuolella: kesäkuu 0 %, heinäkuu 5,9 %, elokuu 7,6 %, syyskuu 11,4 %, lokakuu 0,6 %, marraskuu 15,6 % ja joulukuu 0 %.

Ensimmäisen ajanjakson ensimmäinen *Pseudomonas*-laji löytyi 10.9.2012 ja viimeinen 17.1.2013. Toiminnan muutokset, joiden yhteyttä *Pseudomonas*-lajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää olivat puhtaan huoneen uudet roska-astiat = K3, siivoukseen käytettävän veden vaihtuminen DNA-vapaaseen veteen = Y11 ja vanhemman DNA-eristysautomaatin lyysispuskureiden jaon siirtyminen toiselle yksikölle = H8 (Taulukot 4-6).

Toiminnan muutos K3 tapahtui 3.9.2012. Ennen K3 toiminnan muutosta *Pseudomonas*-lajia löytyi syyskuussa (1.-2.9.2012) 0 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen loppusyksyyskuussa (3.-30.9.2012) 24 kpl. Ennen K3 toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 0 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 122 kpl (Taulukko 21).

Taulukko 21. *Pseudomonas*-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen K3.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| <i>Pseudomonas</i> -löydös | 0 | 24 | 24 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0 | 98 | 98 |
| YB-näytteitä yhteensä | 0 | 122 | 122 |

Seuraavaksi laskettiin *Pseudomonas*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen K3. Odotettujen frekvenssien kahdessa solussa arvo oli <5, jolloin näille soluille tuli tehdä Yatesin korjaus (Taulukko 22).

Taulukko 22. *Pseudomonas*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit Yatesin korjauksella.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| <i>Pseudomonas</i> -löydös | 0,5 | 24,0 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,5 | 98,0 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 23).

H_0 : Roska-astioiden vaihtamisella puhtaassa huoneessa (K3) ei ole yhteyttä *Pseudomonas*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Roska-astioiden vaihtamisella puhtaassa huoneessa (K3) on yhteyttä *Pseudomonas*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 23. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Pseudomonas-löydös | 0,500000 | 0,000000 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,500000 | 0,000000 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 1,000000. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $>0,001$. Tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi suurempi kuin 5 %, joten nollahypoteesia ei hylätä. Roska-astioiden vaihtamisella puhtaassa huoneessa ei ole tilastollisesti merkitsevää yhteyttä Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Laskettiin vielä muuttujien välinen kontingenssikerroin. Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,09, joka on melko lähellä arvoa 0. Muuttujien välillä ei siis esiinny juurikaan minkäänlaista riippuvuutta. Roska-astioiden vaihtamisella puhtaassa huoneessa ei ole kontingenssikertoimen mukaan merkitystä Pseudomonas-kontaminaatiolajin löydösmäärän muuttumiseen.

Toiminnan muutokset Y8 ja H8 tapahtuivat molemmat 11.1.2013. Ennen Y11 ja H9 toiminnan muutoksia Pseudomonas-lajia löytyi syys-tammikuussa (1.9.2012-10.1.2013) 64 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen marras-joulukuussa (11.1.-31.1.2013) 6 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 596 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 107 kpl (Taulukko 24).

Taulukko 24. Pseudomonas-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutosten Y11 ja H8.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| Pseudomonas-löydös | 64 | 6 | 70 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 532 | 101 | 633 |
| YB-näytteitä yhteensä | 596 | 107 | 703 |

Seuraavaksi laskettiin Pseudomonas-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutosten Y11 ja H8 (Taulukko 25).

Taulukko 25. Pseudomonas-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| Pseudomonas-löydös | 59,3 | 10,7 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 536,7 | 96,3 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 26).

H_0 : Siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen (Y11) tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle (H8) ei ole yhteyttä Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen (Y11) tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle (H8) on yhteyttä Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 26. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Pseudomonas-löydös | 0,365029 | 2,033244 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,040367 | 0,224845 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 2,663484. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $>0,05$. Tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi suurempi kuin 5 %, joten nollahypoteesia ei hylätä. Siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle ei ole tilastollisesti merkitsevää yhteyttä Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Laskettiin vielä muuttujien välinen kontingenssikerroin. Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,06, joka on melko lähellä arvoa 0. Muuttujien välillä ei siis esiinny juurikaan minkäänlaista riippuvuutta. Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttuminen ei ole riippuvainen siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle.

Toisen ajanjakson ensimmäinen *Pseudomonas*-laji löytyi 24.7.2013 ja viimeinen 8.11.2013. Toiminnan muutos, jonka yhteyttä *Pseudomonas*-kontaminaatiolajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää oli DNA-vapaan polymeraasin eriin jakamisen lopettaminen = RL15. (Taulukko 7.) Toiminnan muutos RL15 tapahtui 18.10.2013. Ennen toiminnan muutosta *Pseudomonas*-lajia löytyi heinä-lokakuussa (1.7-17.10.2013) 46 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen loka-marraskuussa (18.10.-30.11.2012) 33 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 647 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 285 kpl (Taulukko 27).

Taulukko 27. *Pseudomonas*-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen RL15.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| <i>Pseudomonas</i> -löydös | 46 | 33 | 79 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 601 | 252 | 853 |
| YB-näytteitä yhteensä | 647 | 285 | 932 |

Seuraavaksi laskettiin *Pseudomonas*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen (Taulukko 28).

Taulukko 28. *Pseudomonas*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| <i>Pseudomonas</i> -löydös | 54,8 | 24,2 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 592,2 | 260,8 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 29).

H_0 : PCR-polymeraasin jakamisen lopettamisella (RL15) ei ole yhteyttä *Pseudomonas*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : PCR-polymeraasin jakamisen lopettamisella (RL15) on yhteyttä *Pseudomonas*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Khii toiseen –riippumattomuustesti lasketaan aiemmin mainitun kaavan mukaan (Kuvio 33).

Taulukko 29. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Pseudomonas-löydös | 1,425649 | 3,236473 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,132035 | 0,299744 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 5,093901. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $>0,01$. Tulos on siis tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi pienempi kuin 1 %, joten nollahypoteesi uskalletaan hylätään. PCR-polymeraasin jakamisen lopettamisella on tilastollisesti merkitsevä yhteys Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,07, joka on melko lähellä arvoa 0. Muuttujien välillä ei siis esiinny juurikaan minkäänlaista riippuvuutta. Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttuminen ei ole riippuvainen PCR-polymeraasin jakamisen lopettamisesta.

9. Ralstonia sp.

Ralstonia-laji löytyi vuoden 2010 maaliskuussa 16,7 %. Edeltävänä kuukautena helmikuussa ja seuraavana kuukautena huhtikuussa määrät olivat 0 % (Kuvio 25). Vuoden 2010 helmikuun ja huhtikuun välisenä aikana ei ole kirjattu minkäänlaisia toiminnanmuutoksia. Ralstonia-lajin määrien muutosten välistä yhteyttä toiminnanmuutoksiin ei voitu tässä opinnäytetyössä selvittää.

10. Rhizobium sp.

Rhizobium-lajia oli vuoden 2013 helmikuussa 11,9 % kokonaisnäytämäärästä. Tammikuussa 2013 määrä oli 2,9 % ja vuoden 2012 joulukuussa 0 %. Maaliskuussa 2013 määrä oli jälleen 0 % (Kuvio 27). Ensimmäinen Rhizobium-laji löytyi 21.1.2013 ja viimeinen 22.2.2013. Toiminnan muutokset, joiden yhteyttä Rhizobium-kontaminaatiolajin löydösmäärien muuttumiseen haluttiin selvittää olivat siivoukseen käytettävän veden vaihtuminen DNA-vapaaseen veteen = Y11, vanhemman DNA-eristysautomaatin lyysispuskureiden jaon siirtyminen toiselle yksikölle = H8 ja kaksien steriilien käsineiden käytön aloittaminen YB-PCR:ssä tehtäessä = H9 (Taulukot 4-5).

Toiminnan muutokset Y8 ja H9 tapahtuivat molemmat 11.1.2013. Ennen Y8 ja H8 toiminnan muutoksia *Rhizobium*-lajia löytyi tammikuussa (1.-10.1.2013) 0 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen tammi-helmikuussa (11.1.-28.2.2013) 20 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 27 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 248 kpl (Taulukko 30).

Taulukko 30. *Rhizobium*-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutosten Y11 ja H8.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| <i>Rhizobium</i> -löydös | 0 | 20 | 20 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 27 | 228 | 255 |
| YB-näytteitä yhteensä | 27 | 248 | 275 |

Seuraavaksi laskettiin *Rhizobium*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen. Yhden odotetun frekvenssin solun arvo on <5 , joten tälle solulle tulee tehdä Yatesin korjaus (Taulukko 31).

Taulukko 31. *Rhizobium*-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit Yatesin korjauksella.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| <i>Rhizobium</i> -löydös | 2,5 | 18,0 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 25,0 | 230,0 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 32).

H_0 : Siivouksen käytettävän veden vaihtaminen DNA-vapaaseen veteen (Y11) tai lyysispuskureiden jakamisen siirtäminen toiselle laboratoriolle (H8) ei ole yhteyttä *Rhizobium*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Siivouksen käytettävän veden vaihtaminen DNA-vapaaseen veteen (Y11) tai lyysispuskureiden jakamisen siirtäminen toiselle laboratoriolle (H8) on yhteyttä *Rhizobium*-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 32. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|----------|
| Rhizobium-löydös | 2,463636 | 0,213783 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,154011 | 0,016767 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 2,848197. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $>0,05$. Tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi suurempi kuin 5 %, joten nollahypoteesia ei hylätä. Siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle ei ole tilastollisesti merkitsevää yhteyttä Rhizobium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,10, joka on melko lähellä arvoa 0. Muuttujien välillä ei siis esiinny juurikaan minkäänlaista riippuvuutta. Pseudomonas-lajin löydösmäärän muuttuminen ei ole riippuvainen siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle.

Toiminnan muutos H9 tapahtui 15.2.2013. Ennen kyseistä toiminnan muutosta Rhizobium-lajia löytyi tammi-helmikuussa (1.1-14.2.2013) 7 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen loppuhelmikuussa (15.-28.2.2013) 13 kpl. Ennen toiminnan muutosta YB-PCR-näytteitä oli 206 kpl ja toiminnan muutoksen jälkeen 62 kpl (Taulukko 33).

Taulukko 33. Rhizobium-löydösten ja YB-PCR-näytteiden määrät ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen H9.

| | Ennen | Jälkeen | Yhteensä |
|-----------------------------|-------|---------|----------|
| Rhizobium-löydös | 7 | 13 | 20 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 199 | 49 | 248 |
| YB-näytteitä yhteensä | 206 | 62 | 268 |

Seuraavaksi laskettiin Rhizobium-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit ennen ja jälkeen toiminnan muutoksen H9. Yhden odotetun frekvenssin solun arvo on <5 , joten tälle solulle tulee tehdä Yatesin korjaus (Taulukko 34).

Taulukko 34. Rhizobium-löydösten ja muiden löydösten/negatiivisten odotetut frekvenssit Yatesin korjauksella.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|-------|---------|
| Rhizobium-löydös | 15,4 | 5,1 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 190,6 | 57,4 |

Seuraavaksi asetettiin hypoteesit ja tehtiin khii toiseen –riippumattomuustesti (Taulukko 35).

H_0 : Kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisella YB-PCR:ä tehdessä (H9) ei ole yhteyttä Rhizobium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

H_1 : Kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisella YB-PCR:ä tehdessä (H9) on yhteyttä Rhizobium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Taulukko 35. Khii toiseen –riippumattomuustestin tulokset.

| | Ennen | Jälkeen |
|-----------------------------|----------|-----------|
| Rhizobium-löydös | 4,560513 | 12,090476 |
| Muu löydös tai negatiivinen | 0,367783 | 1,221990 |

Khii toiseen arvoksi saatiin 18,240762. Vapausasteiden määrä oli yksi, jolloin p-arvo on $<0,001$. Tulos on siis tilastollisesti erittäin merkitsevä ja riski hylätä oikeassa oleva nollahypoteesi olisi pienempi kuin 0,1 %, joten nollahypoteesi uskalletaan hylätä. Kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisella YB-PCR:ä tehdessä on tilastollisesti merkitsevä yhteys Rhizobium-lajin löydösmäärän muuttumiseen.

Kontingenssikertoimeksi saatiin 0,25. Muuttujien välillä esiintyy vähäistä positiivista riippuvuutta. Rhizobium-lajin löydösmäärän muuttuminen on hieman riippuvainen kaksien steriilien käsineiden käytön aloittamisesta YB-PCR:ä tehtäessä.

11. Rhodococcus sp.

Rhodococcus-laji löytyi vuoden 2012 helmikuussa 19,1 %. Tammikuussa määrä oli 9,6 % ja maaliskuussa 0 %. Vuoden 2011 joulukuussa määrä oli 1,0 % ja marraskuussa 0 % (Kuvio 29). Ensimmäinen Rhodococcus-laji löytyi 29.12.2011 ja viimeinen 17.2.2012.

Millään toiminnan muutoksella, jotka tulevat tässä opinnäytetyössä esille, ei todennäköisesti ole merkitystä kyseisen kontaminaatiolajin löydösmääriin.

8 Tulosten tarkastelu

Tutkijan tulee osata tehdä oikeat johtopäätökset saaduista tuloksista (Holopainen-Pulkinen 2002: 13). Tutkija voi tehdä vääriä johtopäätöksiä tulkitessaan tilastollisia merkitsevyystestien tuloksia. Tilastollisesti merkitsevä tarkoittaa yksinkertaisesti sitä, että kahden muuttujan välillä on havaittu jonkinlainen yhteys. Se ei tarkoita sitä, että tuloksilla olisi teoreettista tai käytännöllistä merkitsevyyttä tai sitä vastoin, että yhteyttä ei ole, jos tuloksissa ei löydetä tilastollisesti merkitsevää yhteyttä. (Ketokivi 2009: 51.)

Neljän vuoden (2010-2013) aikana YB-PCR-näytteiden määrä on kasvanut nelinkertaiseksi, jolloin myös on nähtävissä kontaminaatiolajimäärienkin kasvaneen lähes samassa tahdissa. Vuonna 2010 kontaminaatiolöydöksiä oli suhteessa verrattain vähemmän kuin muina vuosina (vuonna 2010 2,0 %, vuonna 2011 11,3 %, vuonna 2012 14,4 % ja vuonna 2013 14,2 %). Tästä voisi päätellä, kun näytemäärä kasvaa, myös kontaminaatioiden määrä suhteessa voi kasvaa. Syynä tähän voi olla esimerkiksi DNA-jäämien määrän kasvaminen ympäristössä, kun DNA-eristys- ja PCR-ä tehdään aiempaa enemmän. Tästä kirjoittaa myös Aslanzadeh (2004) mainitessaan yhdeksi potentiaalisiksi kontaminaatiolähteeksi saman kohdesekvenssin jatkuvan monistamisen samassa laboratoriotilassa. Myös näytemäärien lisääntyessä kiihtyvä työtahti vähentää työntekijöiden aikaa PCR-tilojen siivoamiseen ja DNA-jäämien poistamiseen, joka voi joiltain osin selittää lisääntyneitä kontaminaatiomääriä.

Toiminnan muutoksia bakteriologian osaston PCR-laboratoriossa oli tehty kaikkina vuosina. Vuonna 2010 7 kpl, vuonna 2011 10 kpl, vuonna 2012 15 kpl ja vuonna 2013 10 kpl. Eniten toiminnan muutoksia on tehty laitteille ja/tai reagensseille, joka kertoo muun muassa PCR-laboratorion monista menetelmäkehityksistä. Samalla kun menetelmiä kehitetään herkemmiä, jotta menetelmä tunnistaisi paremmin bakteerin DNA:ta, tuo se mukanaan valitettavasti usein myös ongelmia. Herkemmat menetelmät saavat eristettyä näytteistä DNA:ta paremmin ja ne myös tunnistavat entistä paremmin bakteereja, mutta ne tunnistavat myös ympäristössä esiintyviä bakteereja, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia potilastuloksia.

Saatujen tulosten perusteella voidaan päätellä, että joillakin tehdyillä toiminnan muutoksilla on voinut olla merkitystä tiettyjen kontaminaatiolajin määrän lisääntymiseen. Millään toiminnan muutoksella ei tämän opinnäytetyön tulosten mukaan ole tilastollista merkitsevyyttä kontaminaatiolajien määrän vähentymiseen. Mutta kuten Ketokivi (2009: 51) kirjoittaa, tästä ei voida kuitenkaan päätellä, että käytännössä näillä tuloksilla olisi todellista merkitystä. Ainoastaan tilastollinen merkitsevyys havaittiin. Myöskään ei voida tehdä sitä johtopäätöstä, että jollain muulla toiminnan muutoksella ja kontaminaatiolajin määrän muuttumisella ei olisi yhteyttä toisiinsa. Tässä opinnäytetyössä sitä ei tilastollisesti pystytty kuitenkaan todentamaan.

Tilastollista merkitsevyyttä oli Acidovorax-lajin lisääntymisen ja DNA-eristysautomaatin vaihtamisen välillä, josta voisi päätellä, että DNA-eristysautomaatissa käytössä olevat reagenssit eivät ole täysin DNA-vapaita. Tämän vuoksi näytteistä saadaan ajoittain vääriä positiivisia potilastuloksia. Tämän opinnäytetyön tuloksissa ei tule selville, onko kyseinen kontaminaatio-ongelma jatkunut joulukuun 2013 jälkeenkin.

Flavobacterium-lajin lisääntymisen ja uusien alukkeiden/uuden DNA-eristysohjeen välillä todettiin myös tilastollisesti merkitsevä yhteys. Samana päivänä oli tehty kaksi toiminnan muutosta, joten näiden tulosten perusteella ei voida täysin sanoa, kummalla muutoksella on voinut olla merkitystä Flavobacterium-lajin lisääntymiseen. Kumpaankin toiminnan muutokseen liittyy reagenssien (uudet alukkeet) tai käyttötavaroiden (kudoshomogenisaattorin uudet järjestelyt käytettyjen putkien kanssa) muutokset, jotka ovat sinällään pysyviä, mutta joiden LOT-eränumerot vaihtelevat. Voisi päätellä, että esimerkiksi uusien alukkeiden ensimmäinen LOT-eränumero tai kudoshomogenisaattorin putkien tuolloin käytössä ollut erä on voinut olla kontaminoitunut, ja kontaminaatiolaji on hävinnyt, kun uusi LOT-eränumero on otettu käyttöön. Gefrides ym. (2010) kirjoittavat tutkimuksessaan reagenssien LOT-eränumeroista, että kontaminaatiota on harvemmin koko erässä vaan kontaminaatiota on vain pienessä osassa erää vaihtelevin määrin. Tämä voisi selittää sen, miksi kaikista näytteistä kyseisenä ajanjaksona ei tullut tulokseksi Flavobacterium-lajia, vaan kontaminaatio esiintyi vain osassa näytteissä.

Pseudomonas-lajin lisääntymisen ja PCR-polymeraasin jakamisen lopettamisen välillä todettiin tilastollista merkitystä. Vaikka tuloksissa löydettiin tilastollisesti merkitsevä yhteys, käytännössä kyseisellä toiminnan muutoksella ei todennäköisesti ole kuitenkaan ollut yhteyttä löydösmääriin. Pseudomonas-lajia löytyi pidemmän aikavälin aikana, niin

ennen toiminnan muutosta kuin sen jälkeenkin ja kyseistä lajia on löytynyt myös aika ajoin eri määriä. Todennäköisesti *Pseudomonas*-lajin löydökset selittyvät jollakin muulla asialla, joka ei tässä opinnäytetyössä tule esille.

Rhizobium-lajin lisääntymisen ja kaksien käsineiden käytön aloittamisen välillä todettiin myös tilastollisesti merkitsevä yhteys. Ennen toiminnan muutosta on kuitenkin ollut muutamia *Rhizobium*-lajin löydöksiä, joten todennäköisesti kyseisellä toiminnan muutoksella ei ole käytännössä ollut yhteyttä löydösmääriin. Vaikka toisilla toiminnan muutoksilla (siivouksen käytettävän veden vaihtamisella DNA-vapaaseen veteen tai lyysispuskureiden jakamisen siirtämisellä toiselle laboratoriolle) ei löydetty tilastollisesti merkitsevää yhteyttä *Rhizobium*-lajin määrän muuttumiseen, ajankohdallisesti nämä muutokset sopisivat paremmin *Rhizobium*-lajin löydösmäärän lisääntymiseen väliaikaisesti. Tätä ei kuitenkaan voitu tässä opinnäytetyössä tilastollisesti todentamaan.

9 Pohdinta

9.1 Luotettavuus

Opinnäytetyössä on muutamia tekijöitä, jotka ovat voineet vaikuttaa opinnäytetyön luotettavuuteen. Nämä liittyvät muun muassa aineiston keräämiseen sekä muuttujiin, joita ei tässä opinnäytetyössä ole otettu huomioon.

Opinnäytetyössä käsitelty aineisto oli melko laaja. Aineistoa kerätessä vaadittiin kärsivällisyyttä ja pikkutarkkutta, ja mahdollisuus, että aineiston keräysvaiheessa on voinut jokin yksittäinen löydös jäädä huomioimatta, on olemassa. Aineiston keräämiseen olisikin ollut hyvä, että sitä olisi ollut keräämässä esimerkiksi kaksi henkilöä. Näin ollen täysin oikeasta kontaminaatiolöydösmäärästä olisi voinut varmempi. Toiminnan muutoksia ei välttämättä myöskään ole kaikkia kirjattu ylös, joten voi olla, että jokin toiminnan muutos, joka ei tässä opinnäytetyössä tule esille, olisi voinut selittää jonkin kontaminaatilajin määrän vähenemisen tai lisääntymisen.

Opinnäytetyössä ei ole otettu huomioon muita selittäviä tekijöitä kontaminaatiohin, kuin ne mitä on käsitelty. Aineistoa kerätessä ei esimerkiksi otettu huomioon näytelaatua, näytteenottopaikkaa tai näytepurkkia, jotka voivat myös toimia kontaminaatiolähteenä.

Opinnäytetyössä keskityttiin vain kyseisen laboratorion toimintaan. Myöskään ei voida poissulkea sitä, että näytteistä, joista on löytynyt oikea taudinaiheuttajabakteeri, olisi voinut löytyä lisäksi jokin bakteerikontaminaatiolaji. Oikean taudinaiheuttajabakteerin DNA-määrä on voinut olla sen verran suuri, että se on voinut peittää alleen mahdollisen bakteerikontaminaation DNA:n.

Luotettavuuteen vaikuttaa myös henkilökunnan toiminta. Kun toiminnan muutos on otettu käyttöön PCR-laboratoriossa, tarkoittaako se käytännössä sitä, että kaikki henkilökunnan jäsenet ovat muistaneet toimia heti ensimmäisestä toiminnan muutospäivästä lähtien siten, kun on ohjeistettu? Esimerkiksi steriilien käsineiden käytön aloittaminen tai uuden DNA-eristysohjeistuksen käyttäminen. Toiminnan muutospäiviksi merkattiin se päivä, jolloin uusi ohjeistus on annettu tiedoksi koko henkiökunnalle. Käytännössä kaiken kiireen keskellä, ei välttämättä jokainen työntekijä ole muistanut uutta ohjeistusta toteuttaa. Tämä on voinut mahdollisesti vaikuttaa pieneltä osin kontaminaatiolöydösmääriin. Myös se, että kaikkien YB-PCR-positiivisten näytteiden sekvenssien paperiversioita ei löytynyt (18 kpl) ja joidenkin näytteiden (54 kpl) uusintasekvenssianalyysiä ei voitu suorittaa kustannusten takia vaikuttaa tulosten luotettavuuteen. Olisiko näillä 72 kpl:lla voinut löytyä jotain yhteyksiä, jotka nyt jäävät kokonaan löytymättä?

Aineiston analyysimenetelmät tutkimuskysymyksiin 1 ja 2 (ks. sivu 14) ovat luotettavia. Tutkimuskysymys 3 (ks. sivu 14) analyysiin olisi voinut käyttää enemmän aikaa ja käydä toiminnan muutoksia läpi jonkun toisen asiaan perehtyneen henkilön kanssa. Jotkut toiminnan muutokset olisivat sopineet kahteenkin eri kategoriaan esimerkiksi ulkopuolisten siivoajien uusi huonejärjestys siivoamisessa (H1) olisi sopinut sekä henkilökunta että ympäristö kategorioihin.

Kontaminaatiolajien löydösmäärien muuttumisen ja toiminnan muutosten välisten yhteyksien tilastolliseen analyysiin sisältyy muutamia luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä. Kontingenssikerrointa käytettäessä tulee huomioida, että suurin arvo, jonka kontingenssikertoimella voi saada on aina alle 1. Ja jos laskennassa olevassa taulukossa on kaksi saraketta ja kaksi riviä, kuten tässä opinnäytetyössä kaikissa taulukoissa on, suurin mahdollinen arvo kontingenssikertoimelle on 0,71. (KvantiMOTV 2004.) Tässä opinnäytetyössä suurin kontingenssiarvo joka saatiin, oli kuitenkin vain 0,25, joten tässä opinnäytetyössä kontingenssikertoimen vajavaisuus ei todennäköisesti vaikuta tulosten tulkintaan. Valli (2001: 62-63) kirjoittaa, että ristiintaulukointia tehtäessä

pieniä luokkia saa olla korkeintaan 20%. Tämä ei toteudu opinnäytetyön jokaisessa taulukossa, joten tämä heikentää opinnäytetyön tutkimustuloksia tältä osin.

9.2 Eettisyys

Tutkijan tulee ottaa huomioon kaikissa eri tutkimuksen vaiheissa eettiset periaatteet: niin aiheen valinnassa, aineiston hankinnassa sekä analyysissä kuin tulosten tulkinnassa ja raportoinnissa (Viskari 2009: 108). Tutkijan tulee kaikissa tutkimuksen vaiheissa välttää epärehellisyyttä. Toisen tekstiä ei tule plagioida väittäen sitä omakseen (myöskään omaa tekstiä ei saa plagioida), tulosten raportointi ei saa olla puutteellista ja saatuja tuloksia ei tule yleistää ilman kritiikkiä. (Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2000 : 27-28.) Tutkijan tuleekin kirjoittaa eettisten periaatteiden mukaisesti koko tutkimuksen läpi. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (TEN) mukaan tutkimuksessa tulee muun muassa viitata asianmukaisesti aikaisempiin tutkimustuloksiin, tutkimustulokset tulee esittää huolellisesti ja niin kuin ne ovat sekä muiden tutkijoiden saavutuksia tulee kunnioittaa arvioitaessa omia tutkimustuloksia aiempiin tutkimustuloksiin. Omia tutkimustuloksia ei saa myöskään vääristellä tai keksiä. (Viskari 2009: :109-110.)

Aiheen valinnassa eettiset periaatteet liittyvät siihen, mistä lähtökohdista aihetta halutaan tutkia. Mitä arvoja tutkijalla valittuun lähtökohtaan kuuluu, miksi asiaa halutaan tutkia ja mitä siitä voi seurata? Osaako tutkija valita aiheen puolueettomasti? Aineiston hankinnassa tulee ottaa huomioon tutkimuksiin liittyvien henkilöiden anonymisuus sekä aineiston luottamuksellinen kerääminen ja aineiston asianmukainen tallentaminen. Aineiston analyysimenetelmät tulee esittää huolellisesti ja oikeellisesti. Tulosten raportoinnissa tutkijan tulee esittää kaikki saadut tulokset rehellisesti, kertoa kaikki käytetyt tutkimusmenetelmät sekä arvioida tutkimuksen luotettavuutta puolueettomasti. (Viskari 2009: 108; Heikkilä 2004: 30-31; Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2000: 27)

Tämän opinnäytetyön aiheen lähtökohta tuli suoraan työyksikköön liittyvästä ongelmasta. Opinnäytetyön tekijällä ei ollut puolueellista näkökulmaa tutkittavaan asiaan, vaan halu kartoittaa, mitä kontaminaatiolajeja PCR-laboratoriossa on esiintynyt vuosien 2010-2013 aikana sekä selvittää, onko jollakin toiminnan muutoksella ollut tilastollisesti merkitsevää yhteyttä jonkin kontaminaatiolajin määrän muuttumiseen.

Osa opinnäytetyön aineistosta saatiin laboratorion potilastietojärjestelmästä. Tutkittavana kohteena oli potilasnäytteet, mutta vain näytteen tuloksen osalta. Tarvittava

aineisto saatiin potilastietojärjestelmän muistilapulta, eikä muita tietoja näytteestä tai potilaan henkilötietoja otettu ollenkaan ylös. Opinnäytetyössä ei siis käsitellä mitään potilastunnistetietoja tai näytenumeroita, eikä näin ollen potilaan yksityisyydensuoja ole vaarantunut. Koko opinnäytetyön aineisto on asianmukaisesti tallennettu Excel-tiedostoon, joten aineistoa voidaan käyttää myös jälkikäteen tarvittaessa.

Analyysimenetelmät ovat kuvattu juuri niin kuin niitä on opinnäytetyössä käytetty ja opinnäytetyössä saadut tulokset on esitelty rehellisesti ja asianmukaisesti, eikä mitään tuloksia ole jätetty kertomatta. Tuloksia on myös arvioitu kriittisesti ja puolueettomasti. Muiden tutkijoiden tuloksia on kunnioitettu ja opinnäytetyössä saatuja tuloksia on viitattu rehellisesti aiempiin tutkimustuloksiin.

9.3 Tulosten johtopäätökset ja kehittämis ehdotukset

Opinnäytetyöllä haluttiin selvittää, mitä erilaisia kontaminaatiolöydöksiä PCR-laboratoriossa on esiintynyt, miten kontaminaatiolajien määrät ovat muuttuneet ja mitä toiminnan muutoksia PCR-laboratoriossa on tehty vuosien 2010-2013 aikana sekä minkälainen yhteys toiminnan muutoksilla on ollut kontaminaatiolajien määrän muuttumiseen. Tavoitteena oli saada lisätietoa avuksi PCR-laboratoriolle tulevaisuutta ajatellen, koska kontaminaatioista PCR-työskentelyssä ei varmaan koskaan päästä täysin eroon.

Tämän opinnäytetyön perusteella voidaan todeta, että kontaminaatioita klinisen bakteriologian PCR-laboratoriossa on ollut aika ajoin, joistain lajeista on päästy eroon ja jotkut lajit ilmaantuvat uudestaan kerran jo hävittyään. Tämä voi olla osoitus muun muassa PCR-menetelmän herkkyydestä ja siitä, että laboratorioympäristössä on koko ajan bakteereja, jotka voivat aiheuttaa kontaminaatioita. PCR-laboratoriossa on tehty paljon toiminnan muutoksia, joiden avulla on pyritty parantamaan laboratorion toimintaa kontaminaatioiden ehkäisemiseksi ja myös parantamaan menetelmien herkkyyttä löytämään taudinaiheuttajabakteereita potilasnäytteistä.

Montakaan yhteyttä toiminnan muutosten ja kontaminaatiolöydöslajien määrien muuttumiseen ei löytynyt, vaikka erilaisia toiminnan muutoksia oli tehty useita ja erilaisia kontaminaatiolöydöksiäkin oli ollut paljon. Tulosten analysoinnissa tehtiin tiettyjä rajoituksia löydösten prosentuaalisten määrien mukaan, minkä kontaminaatiolajin ja toiminnan muutoksen yhteyttä haluttiin selvittää. Jos rajoituksia ei olisi tehty, olisiko voinut

löytyä vielä muita yhteyksiä jonkin kontaminaatiolajin löydösmäärän muuttumisen ja toiminnan muutoksen välillä?

Monissa eri tutkimuksissa (Witt ym. 2009; Shen ym. 2006; Tilburg ym. 2010; Corless ym. 2000; Lai ym. 1998) oli pystytty todistamaan, että erilaisissa PCR-työssä käytettävissä reagensseissa oli todettu kontaminaatioita. Näihin tuloksiin lisättynä vielä Gefrideksen ym. (2010) ajatus siitä, että harvoin reagenssin koko LOT-erä on kontaminoitunut, voisi epäillä, että reagenssit ovat yksi suurimmista syistä kontaminaatio-ongelmiin. Tällä selittyisi osittain se, minkä takia klinisen bakteriologian PCR-laboratoriossakin kontaminaatiolajeja on löytynyt niin monia erilaisia, miksi lajit häviävät ja tulevat uudestaan esiin ja miksi kontaminaatiot ilmaantuvat usein vain tietyssä osaa sarjan näytteistä. Toki muitakaan syitä ei voida poissulkea ilman lisätutkimuksia. Mahdollisia kontaminaatiolähteitä voi olla myös muita, joita kukaan ei osaa edes epäillä ja joita ei tässä opinnäytetyössäkään ole osattu ottaa huomioon. Tärkeintä PCR-töitä tehdessä onkin muistaa koko ajan kontaminaatiolöydöksen mahdollisuus positiivisia potilastuloksia tulkittaessa ja se, että tarkoilla ja hyvin suunnitelluilla PCR-työskentelytavoilla on varmasti oma merkityksensä kontaminaatioiden ehkäisemisessä.

Opinnäytetyön tulosten pohjalta voidaan todeta, että ensimmäisenä ei kannata lähteä etsimään syitä kontaminaatiolöydöksiin. Syytä ei välttämättä ikinä saada selville ja syyn selvittelyyn voi kulua tarpeettomasti resursseja sekä henkilökunnan että reagenssien osalta. Opinnäytetyön ehdotuksena on, kun kontaminaatio on havaittu, tulisi ensimmäiseksi ottaa huomioon kaikki mahdolliset kontaminaatiolähteet, joita tässäkin opinnäytetyössä on esitetty, ja tehdä tarvittavat toimenpiteet kontaminaation hävittämiseksi. Kaikki käytössä olleet sekä DNA-eristys- että PCR-reagenssit tulisi hävittää kokonaan ja käyttöön otettaisiin uudet reagenssit (uusi LOT-erä). Samalla tulisi dekontaminoida kaikki käyttötavarat sekä vaihtaa kaikki välineet ja henkilökunnan käyttämät vaatteet puhtaisiin. Käytössä ollut käsinelaatikko tulisi heittää pois ja avata uusi tilalle. Näillä toimenpiteillä olisi poissuljettu suurelta osin reagensseista, henkilökunnasta tai ympäristöstä mahdollisesti tulleet kontaminaatiot. Toimenpiteiden jälkeen seurattaisiin, hävisikö kontaminaatiolaji ja vasta tämän jälkeen tarvittaessa lähdetäisiin etsimään kontaminaation syytä, jos kontaminaatio ei ole hävinnyt. Näillä edellä mainituilla toimenpiteillä voitaisiin mahdollisesti päästä kontaminaatiosta nopeasti eroon eikä henkilökunnan työaikaa tai organisaation taloudellisia resursseja käytettäisi mahdollisesti turhaan kontaminaatioiden selvittelyyn.

PCR-laboratoriossa on tehty paljon toiminnan muutoksia vuosien 2010-2013 aikana ja kaikki muutokset ovat varmasti omalta osaltaan parantaneet PCR-laboratorion toimintaa kontaminaatioita ajatellen, vaikka tämän opinnäytetyön tulokset eivät sitä paljasta. Työskentelytapoja ja muita toimintoja on jatkossakin hyvä päivittää lukemalla tuoreita tutkimuksia, sillä uusia kontaminaatioiden ehkäisemiskeinoja varmasti keksitään tulevaisuudessakin lisää, kun tieto ja ymmärrys kontaminaatioista paranee.

Olisi mielenkiintoista tutkia jatkossa jonkin yksittäisen kontaminaatiolajin esiintyvyyttä ja mahdollisia syitä siihen. Esimerkiksi *Pseudomonas*-lajia löytyy aika ajoin, joten kyseisen lajin esiintyvyyttä olisi mielenkiintoista tutkia tarkemmin ja ottaa enemmän muuttujia mukaan, joiden yhteyttä kyseisen lajin löydösmäärän muuttumiseen voitaisiin selvittää. Parasta olisi, jos *Pseudomonas*-lajin esiintyvyyteen löytyisi jokin yksittäinen syy ja näin kyseisestä kontaminaatiolajista voitaisiin mahdollisesti päästä kokonaan eroon. Myös muita kontaminaatiolajeja, jotka esiintyvät aina ajoittain, olisi mielenkiintoista tutkia tarkemmin.

Lähteet

Aalto, Juha-Matti – Andersson, Maria – Aro, Paavo – Bonsdorff, Carl-Henrik von – Haahtela, Kielo – Hatakka, Annele – Hielm, Sebastian – Hänninen, Marja-Liisa – Johansson, Tuula – Kolari, Marko – Korkeila, Maija – Kähkönen, Mika – Kääriäinen, Leevi – Liukkonen, Mikko – Lounatmaa, Kari – Maija, Pekka – Maunula, Leena – Niemelä, Seppo – Nieminen, Timo – Nissinen, Antti – Palva, Airi – Pirttijärvi, Tuija – Puhakka, Jaakko – Pönkä, Antti – Romantschuk, Martin – Salkinoja-Salonen, Mirja – Saris, Per – Savilahti, Harri – Saxelin, Maija-Liisa – Sen, Robin – Siitonen, Anja – Sivonen, Kaarina – Smolnader, Aino – Surakka, Anu – Tirola, Marja – Timonen, Tuomo – Vuoriranta, Pertti – Wittmann, Christophe 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Aslanzadeh, Jaber 2004. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 34 (4). 389-396.

Bonne, Nicolai – Clark, Phillip – Shearer, Patrick – Raidal, Shane 2008. Elimination of false-positive polymerase chain reaction results from hole punch carryover contamination. *Veterinary Diagnostic Investigation* 20 (1). 60-63.

Brost, Annemarie – Box, Adrienne – Fluit, Ad 2004. False-positive results and contaminations in nucleic acid amplification assays. Suggestions for a 'prevent and destroy'-strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23. 289-299.

Brown, Terence A. 2006. Gene cloning & DNA analysis. An Introduction. 5th edition. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty.

Corless, C.E – Guiver, M. – Borrow, R. – Edwards-Jones, V. – Kaczmarek, E.B. – Fox, A.J. 2000. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (5). 1747-1752.

Ganten, Detlev – Deichman, Thomas – Spahl, Thilo. 2007. Luonto, tiede ja elämä. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy.

Gefrides, Lisa A. – Powell, Mark C. – Donley, Michael A. – Kahn, Roger 2010. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. Forensic Science International: Genetics 4. 89-94.

Glick, Bernard R. – Pasternak, Jack J. – Patten, Cheryl L. 2010. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. 4th edition. USA: ASM Press.

Heikkilä, Tarja 2004. Tilastollinen tutkimus. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula 2000. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka 2002. Tilastolliset menetelmät. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Ketokivi, Mikko 2009. Tilastollinen päättely ja tieteellinen argumentointi. Helsinki: Oy Yliopistokustannus, HYY Yhtymä.

Hellstén, Soile (toim.) 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Suomen Kuntaliitto Oy. Jyväskylä.

KvantiMOTV. 2004. Korrelaatio ja riippuvuusluvut.
<<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/korrelaatio/korrelaatio.html>>. Päivitetty 28.1.2004. Luettu 17.11.2014.

KvantiMOTV. 2011. Ristiintaulukon riippumattomuustesti.

<<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/ristiintaulukointi/khii2.html>>. Päivitetty 9.12.2011. Luettu 19.10.2014.

Lai, Kwan Kew – Brown, Barbara A. – Westerling, Judy A. – Fontecchio, Sally A. – Zhang, Yansheng – Wallace, Richard J. Jr. 1998. Long-term laboratory contamination by *Mycobacterium abscessus* resulting in two pseudo-outbreaks: recognition with use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction. CID 27. 169-175.

Mikrobien desinfiointi UV-valolla. 2010. Tofte yhtiöt Oy.

<<http://www.haistahome.fi/bakteereiden+ja+homeen+desinfiointi/mikrobien+desinfiointi+uv-valolla/>>Luettu: 16.10.2013.

Patel, Poorvi – Garson, Jeremy A. – Tettmar, Kate I. – Ancliff, Siobhan – McDonald, Carl – Pitt, Tyrone – Coelho, Juliana – Tedder, Richard S. 2012. Development of anethidium monoazide-enhanced internally controlled universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction assay for detection of bacterial contamination in platelet concentrates. 52. 1423-1432.

Shen, Hua – Rogelj, Snezna – Kieft, Thomas L. 2006. Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by *Legionella pneumophila* in commercial reagents. Molecular and Cellular Probes 20 (3-4). 147-153.

Sojakka, Kirsi – Välimäki, Maija-Liisa 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Helsinki: Opetushallitus.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.

Tilburg, Jeroen J. H. C. Tilburg – Nabuurs-Franssen, Marringje H. – Hannen, Erik J van – Horrevorts, Alphons M. – Melchers, Willien J. G. – Klaassen, Corne H.

W. 2010. Contamination of Commercial PCR Master Mix with DNA from *Coxiella burnetii*. *Journals of Clinical Microbiology* 48 (12). 4634–4635.

Valli, Raine 2001. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. Jyväskylä: PS-kustannus.

Viskari, Sinikka 2009. Tieteellisen kirjoittamisen perusteet. Opas kirjoittamiseen ja seminaarityöskentelyyn. 5. uudistettu painos. Tampere: Tampereen yliopisto.

Witt, Nina – Rodger, Gillian – Vandesompele, Jo – Benes, Vladimir – Zumla, Alimuddin – Rook, Graham A. – Huggett, Jim F. 2009. An Assessment of Air As a Source of DNA Contamination Encountered When Performing PCR. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*. 20(5). 236-240.